

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

09 March 2000 (09.03.00)

International application No.:

PCT/JP99/04622

Applicant's or agent's file reference:

661463

International filing date:

27 August 1999 (27.08.99)

Priority date:

28 August 1998 (28.08.98)

Applicant:

ITOH, Kyogo et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

24 January 2000 (24.01.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

BEST AVAILABLE COPY

2. The election



was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED

OCT 26 2001
TECH CENTER 1600/2000

Applicant's or agent's file reference 661463	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04622	International filing date (day/month/year) 27 August 1999 (27.08.99)	Priority date (day/month/year) 28 August 1998 (28.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, 5/10, C12P 21/02, C07K 14/47, 16/30, A61K 31/70, 48/00, 38/17, 39/00, 35/12		
Applicant ITOH, Kyogo		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 24 January 2000 (24.01.00)	Date of completion of this report 28 September 2000 (28.09.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04622

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 99/04622

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-31	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-31	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-31	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Shigeki Shichijo et al., "A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes", J. Exp. Med. (February 2 1998), Vol. 187, No. 3, pp. 277-288

Document 2: Rui Goohara et al., "Histocompatibility leukocyte antigen-A2402-restricted cytotoxic T lymphocytes recognizing adenocarcinoma in tumor infiltrating lymphocytes of patients with colon cancer", Jpn. J. Cancer Res. (February 1997), Vol. 88, No. 2, pp. 198-204

Document 3: Takahiro Nagase et al., "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IV. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0121-KIAA0160) deduced by analysis of cDNA clones from human KG-1", DNA Res. (Aug. 1995), Vol. 2, No. 4, pp. 167-174

Document 4: P. Yotnda, "Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV6-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia", J. Clin. Invest. (July 1998), Vol. 102, No. 2, pp. 455-462

Document 5: Takenori Takahashi, "Recognition of gp43 tumor-associated antigen peptide by both HLA-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 99/04622

A2 restricted CTL lines and antibodies from melanoma patients", Cellular Immunology (Jun 15 1997), Vol. 178, No. 2, pp. 162-171

The invention described in Claims 1-31 involves an inventive step relative to Documents 1-5 cited in the international search report. Documents 1-2 do not disclose a protein comprising the amino acid sequence given in SEQ ID NO: 1 or DNA comprising the nucleotide sequence given in SEQ ID NO: 2 or a cancer antigen which is a partial peptide thereof and is recognized by cytotoxic T cells by binding with HLA antigen, and this feature could not be derived easily by a person skilled in the art from Document 1-5.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(translation)

INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURERECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSITissued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

NAME: Kyogo Itoh

ADDRESS: 2-25-9, Keyaki-dai, Kiyama-cho,
Miyaki-gun, Saga-ken, Japan

1. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISMS	
Identification reference given by the DEPOSITOR esophageal cancer cell line KE-4	(Deposit No.) FERM BP-5955
2. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation	
3. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism as identified under 1 above, which was received by it on May 23, 1997 (dated of the original deposit).	
4. RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
This International Depositary Authority received the microorganism as recited in the above item 1 on _____, (dated of the original deposit) and then received a request for transfer the original deposit to International deposition under Budapest Treaty on _____.	
5. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology Dr. Michio Oishi, Director-General. Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, JAPAN May 23, 1997	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

伊東 恭悟

殿

寄託者

あて名 〒

佐賀県三養基郡基山町けやき台 2-25-9

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

食塩耐細胞株 KE-4

(受託番号)

FERM BP- 5955

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 株の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 9 年 5 月 23 日 (原寄託日) に受領した 1 株の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、
年 月 日 (原寄託日) に 1 株の微生物を受領した。
そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Agency for Industrial Science and Technology

所長 大石 道夫

Michio Oishi, DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken

305, JAPAN

平成 9 年 (1997) 5 月 23 日

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 661463	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04622	国際出願日 (日.月.年) 27.08.99	優先日 (日.月.年) 28.08.98
出願人(氏名又は名称) 伊東 恭悟		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 15/12, C12N 5/10, C12P 21/02, C07K 14/47, C07K16/30, A61K 31/70, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/00, A61K 35/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq MEDLINE (STN) REGISTRY (STN) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Shigeki Shichijo et al. "A Gene Encoding Antigenic Peptides of Human Squamous Cell Carcinoma Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes" J. Exp. Med (February 2, 1998) Vol. 187. No. 3 P. 277-288	1-31
A	Rumi Gohara "Histocompatibility Leukocyte Antigen-A2402-restricted Cytotoxic T Lymphocytes Recognizing Adenocarcinoma in Tumor-infiltrating Lymphocytes of Patients with Colo-rectal Cancer" Jpn. J. Cancer Res (February, 1997) Vol. 88 No. 2 P. 198-204	1-31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 11. 99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) : 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	✓ Takahiro Nagase "Prediction of the Coding sequences of Unidentified Human Genes. IV. The Coding of 40 New Genes (KIAA0121-KIAA0160) Deduced by Analysis of cDNA Clones from Human Cell Line KG-1" J. Clin. Invest. (August 1995) Vol. 2 No. 4 P. 167-174	1-31
A	✓ P. Yotnda "Cytotoxic T cell Response against the Chimeric ETV 6-AML1 Protein in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia" J. Clin. Invest. (July 1998) Vol. 102 No. 2 P. 455-462	1-31
A	✓ Takenori Takahashi "Recognition of gp43 Tumor-Associated Antigen Peptide by both HLA-A2 Restricted CTL Lines and Antibodies from Melanoma Patients" Cellular Immunology (June 15, 1997) Vol. 178 No. 2 P. 162-171	1-31

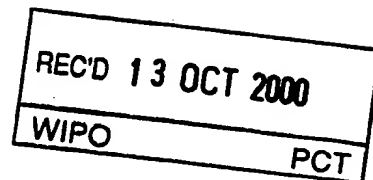
THIS PAGE BLANK (USPTO)

15T

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 661463	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/04622	国際出願日 (日.月.年) 27.08.99	優先日 (日.月.年) 28.08.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12N 15/12, C12N 5/10, C12P 21/02, C07K 14/47, C07K 16/30, A61K 31/70, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/00, A61K 35/12		
出願人 (氏名又は名称) 伊東 恭悟		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 24.01.00	国際予備審査報告を作成した日 28.09.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 印	4 B 9358
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-31	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-31	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-31	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: Shigeki Shichijo et al. "A Gene Encoding Antigenic Peptides of Human Squamous Cell Carcinoma Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes" J. Exp. Med (February 2, 1998) Vol. 187. No. 3 P. 277-288

文献2: Rumi Gohara "Histocompatibility Leukocyte Antigen-A2402-restricted Cytotoxic T Lymphocytes Recognizing Adenocarcinoma in Tumor-infiltrating Lymphocytes of Patients with Coiono Cancer" Jpn. J. Cancer Res (February, 1997) Vol. 88 No. 2 P. 198-204

文献3: Takahiro Nagase "Prediction of the Coding sequences of Unidentified Human Genes. IV. The Coding of 40 New Genes(KIAA0121-KIAA0160) Deduced by Analysis of cDNA Clones from Human Cell Line KG-1" J. Clin. Invest. (August 1995) Vol. 2 No. 4 P. 167-174

文献4: P. Yotnda "Cytotoxic T cell Response against the Chimeric ETV6-AML1 Protein in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia" J. Clin. Invest. (July 1998) Vol. 102 No. 2 P. 455-462

文献5: Takenori Takahashi "Recognition of gp43 Tumor-Associated Antigen Peptide by both HLA-A2 Restricted CTL Lines and Antibodies from Melanoma Patients" Cellular Immunology (June 15, 1997) Vol. 178 No. 2 P. 162-171

請求の範囲1~31に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1~5に対して進歩性を有する。文献1~2には、配列番号: 1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、及び、配列番号: 2に記載の塩基配列からなるDNA、並びに、その部分ペプチドであってHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドが記載されておらず、しかもその点は文献1~5から当業者といえども容易に想到し得ないものである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許力条約に基づいて公開され、国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 5/10, C12P 21/02, C07K 14/47, 16/30, A61K 31/70, 48/00, 38/17, 39/00, 35/12	A1	(11) 国際公開番号 WO00/12701 (43) 国際公開日 2000年3月9日(09.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04622 (22) 国際出願日 1999年8月27日(27.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/242660 ✓ 1998年8月28日(28.08.98) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 伊東恭悟(ITO, Kyogo)[JP/JP] 〒841-0205 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9 Saga, (JP) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社(SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 中尾真修(NAKAO, Masanobu)[JP/JP] 〒831-0021 福岡県大川市大字大橋277-1 Fukuoka, (JP)		(74) 代理人 青山 蓓, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユー ラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料 の寄託に関する表示。
(54) Title: NOVEL TUMOR ANTIGEN PROTEIN SART-3 AND TUMOR ANTIGEN PEPTIDE THEREOF (54) 発明の名称 新規な腫瘍抗原タンパク質SART-3、およびその腫瘍抗原ペプチド (57) Abstract A novel tumor antigen protein; its gene; a tumor antigen peptide derived from this tumor antigen protein; derivatives of these substances; and remedies, preventives, diagnostics, etc. for tumor with the use of these substances <i>in vivo</i> or <i>in vitro</i> .		

(57)要約

新規な腫瘍抗原タンパク質及びその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれらをin vivoまたはin vitroで利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬等を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア		ニュー・ジーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

新規な腫瘍抗原タンパク質 S A R T - 3、およびその腫瘍抗原ペプチド
技術分野

5 本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドに関する。さらに詳しくは、本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれら腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、腫瘍抗原ペプチドまたはこれらの誘導体を、in vivoまたはin vitroで利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬などに関する。

10 背景技術

 生体による腫瘍の排除には、免疫系、特にT細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。実際、ヒトの腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示すリンパ球の浸潤が認められ (Arch. Surg., 126:200, 1990)、メラノーマからは自己の腫瘍細胞を認識する細胞傷害性T細胞 (C T L) が比較的容易に分離されている (Immunol. Today, 8:385, 1987、J. Immunol., 138:989, 1987、Int. J. Cancer, 52:52, 1992等)。また、該C T Lの移入によるメラノーマ治療の臨床結果からも、腫瘍排除におけるT細胞の重要性が示唆されている (J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159, 1994)。

20 自己の腫瘍細胞を攻撃するC T Lが標的とする分子については長い間不明であったが、最近の免疫学および分子生物学の進歩により次第に明らかになってきた。すなわちC T Lは、T細胞受容体 (T C R) を用いて、腫瘍抗原ペプチドと呼ばれるペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラスI抗原 (M H CクラスI抗原、ヒトの場合はH L A抗原と呼ばれる) との複合体を認識することにより、自己の腫瘍細胞を攻撃していることが明らかとなった。

25 腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテアソームにより細胞内で分解されることによって生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でM H CクラスI抗原 (H L A抗原) と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示された複合体を腫瘍特異的なC T Lが認識し、細胞傷害作用やリン

フォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌ワクチンとして利用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的CTLを増強させる治療法が可能となった。

- 5 腫瘍抗原タンパク質としては、1991年にT. Boonらが初めてMAGEと名付けたタンパク質をヒトメラノーマ細胞から同定した (Science, 254:1643, 1991)。その後、いくつかの腫瘍抗原タンパク質が、主にメラノーマ細胞から同定されている。メラノーマ抗原としては、メラノサイト組織特異的タンパク質である gp 100 (J. Exp. Med., 179:1005, 1994)、MART-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3515, 1994)、チロシナーゼ (J. Exp. Med., 178:489, 1993) などのメラノソームタンパク質、メラノーマだけでなく各種癌細胞と正常精巣細胞に発現するMAGE関連タンパク質群 (J. Exp. Med., 179:921, 1994)、腫瘍特異的なアミノ酸変異を持つ β -カテニン (J. Exp. Med., 183:1185, 1996)、CDK 4 (Science, 269:1281, 1995) などが同定されている。また、メラノーマ以外
- 10 の腫瘍抗原タンパク質としては、HER2/neu (J. Exp. Med., 181:2109, 1995)、p53 (変異型) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14704, 1996) などの癌遺伝子産物、CEA (J. Natl. Cancer. Inst., 87:982, 1995)、PSA (J. Natl. Cancer. Inst., 89:293, 1997) などの腫瘍マーカー、HPV (J. Immunol., 154:5934, 1995)、EBV (Int. Immunol., 7:653, 1995) などのウイルスタン
- 15 パク質などが同定されている。これらについては、総説 (Immunol. Today, 18:267, 1997、J. Exp. Med., 183:725, 1996、Curr. Opin. Immunol., 8:628, 1996等) の記述に詳しい。

25 腫瘍抗原タンパク質や腫瘍抗原ペプチドを腫瘍の治療や診断に応用するためには、メラノーマに比べて発生頻度が圧倒的に高い扁平上皮癌 (食道癌、肺癌等) などに幅広く適応可能な腫瘍抗原の同定が重要である。これに関して、本発明者らは食道癌由来の扁平上皮癌細胞から腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを行い、HLAの型がHLA-A24あるいはHLA-A26であるHLA抗原に結合して提示されるいくつかの腫瘍抗原ペプチドを、メラノーマ以外の腫瘍細胞から初めて同定した (J. Exp. Med., 187:277, 1998、国際公開第97/46676号パンフレッ

ト)。

これらの腫瘍抗原ペプチドを実際に臨床に適用する際には、1種のみならず、複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを使用することが好ましいかもしれない。すなわち、全ての癌細胞が共通に同一の腫瘍抗原を発現しているとは限らず、また、一つの癌細胞上に2種以上の異なる腫瘍抗原ペプチドが提示されていることを考慮すると、複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを用いた治療がより効果的であると考えられる。事実、メラノーマにおいては、単一の腫瘍抗原由来のペプチドのみでは効果が不十分であったことから、複数のペプチドのカクテル製剤の開発が試みられている (Int. J. Cancer, 66:162, 1996、Int. J. Cancer, 67:54, 1996)。このような背景もあり、発生頻度の高い扁平上皮癌等に幅広く適用可能な、新たな腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドの同定が望まれている状況にある。

発明の開示

本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドを提供することを目的とする。すなわち本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれら腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、腫瘍抗原ペプチドまたはこれらの誘導体を、in vivoまたはin vitroで利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬などを提供することを目的とする。本発明の腫瘍抗原ペプチドは、日本人の約60%が保有しているHLA抗原であるHLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチド、および、日本人および白人の約40%が保有しているHLA抗原であるHLA-A2に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドを含むものであることから、多くの患者に適用可能である。さらに、ヒトの癌でもっとも多く認められる扁平上皮癌等に応用できるものであるため、新規な抗腫瘍剤としての有用性が期待される。ちなみに扁平上皮癌のうち食道癌や肺癌での扁平上皮癌は、現在の化学療法や放射線療法に比較的抵抗性を示すことが知られている。その点からも、本発明の腫瘍抗原ペプチドの開発が期待される。

本発明者らは、新規な腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドを得るために、以下の試みを行った。

まず本発明者らは、食道癌細胞株KE-4 (FERM BP-5955) 由来のcDNAライブラリ

一を作製し、該ライブラリーの組換えプラスミドとHLA-A2402(HLA-A24の一種)cDNAの組換えプラスミドを繊維芽細胞株VA-13細胞(理化学研究所細胞開発銀行)にダブルトランスフェクトし、そのトランスフェクタントに対し、KE-4に対するCTLであるKE-4CTL(FERM BP-5954)を作用させ、KE-4CTLが活性化されるか否かをIFN- γ の産生量で測定するというスクリーニングを繰り返した。当該スクリーニングにより新規かつ有用な腫瘍抗原タンパク質が得られるという保証はなかったが、本発明者らは膨大なスクリーニングを繰り返した結果、最終的に、1つの腫瘍抗原タンパク質の遺伝子のクローニングに成功した。本発明者らは該遺伝子によりコードされる腫瘍抗原タンパク質を「SART-3」と命名した。

このSART-3の塩基配列を既知の配列と比較したところ、該SART-3の塩基配列は、GenBankデータベースにおいて Accession No. D63879として登録されている機能不明の遺伝子KIAA0156と1塩基相違する新規な塩基配列であった。

本発明者らはさらに、SART-3のアミノ酸配列中、HLA-A24およびHLA-A2に結合して提示される腫瘍抗原ペプチド部分を同定し、これらのペプチドに腫瘍抗原ペプチドとしての活性の存することを明らかにした。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明の要旨は、

(1) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなる変異タンパク質、をコードするDNA(ただし、該タンパク質および変異タンパク質は、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである)、

(2) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA、又はそのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異DNA(ただし、該DNAおよび変異DNAが発現して生産されるタンパク質は、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである)、

(3) 前記(1)または(2)記載のDNAを有する発現プラスミド、

(4) 前記(3)記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体、

(5) 前記(4)記載の形質転換体を培養し、発現される組換えタンパク質を

回収することからなる、組換えタンパク質の生産方法、

(6) 前記(1)または(2)記載のDNAによりコードされるか、または前記(5)記載の生産方法により生産される、腫瘍抗原タンパク質、

5 (7) 前記(1)または(2)記載のDNA、あるいは前記(6)記載のタンパク質を有効成分として含有する医薬、

(8) 前記(1)または(2)記載のDNA、あるいは前記(6)記載のタンパク質を有効成分として含有する、腫瘍の治療剤または予防剤、

10 (9) 前記(6)記載のタンパク質の一部よりなる部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

(10) HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A2である前記(9)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

15 (11) 配列番号：3～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(10)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

(12) 配列番号：3～配列番号：9、または配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(11)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

20 (13) 配列番号：3～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(11)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

25 (14) 配列番号：3～配列番号：9、または配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(13)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

(15) 配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンに置換さ

れ、および／またはC末端のアミノ酸残基がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記（１３）記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

- 5 （１６） 配列番号：２５～配列番号：５２のいずれかに記載のアミノ酸配列の第２位がロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換され、および／またはC末端のアミノ酸残基がバリンまたはロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記（１３）記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

- 10 （１７） 配列番号：５３～配列番号：６４のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記（１４）記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

- 15 （１８） 前記（９）～（１７）いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも１種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤、

- （１９） 前記（９）～（１７）いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするDNAの少なくとも１種を含有する組換えDNA、

- （２０） 前記（１９）記載の組換えDNAを発現させて得られうる組換えポリペプチド、

- 20 （２１） 前記（１９）記載の組換えDNAまたは前記（２０）記載の組換えポリペプチドを有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤、

- （２２） 前記（６）記載のタンパク質、前記（９）～（１７）いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、のいずれかに特異的に結合する抗体、

- 25 （２３） 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA抗原と前記（９）～（１７）いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞、

- （２４） 前記（１）または（２）記載のDNA、前記（６）記載の腫瘍抗原タンパク質、前記（１９）記載の組換えDNA、あるいは前記（２０）記載の組換えポリペプチドを、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込

ませて得られうる、HLA抗原と腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体の提示された抗原提示細胞、

(25) 前記(23)または(24)記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤、

5 (26) HLA抗原と前記(9)～(17)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞、

(27) 前記(23)または(24)記載の抗原提示細胞に提示されたHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞、

10 (28) 前記(26)または(27)記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤、

(29) 前記(9)～(17)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、前記(6)記載のタンパク質、あるいは前記(20)記載の組換えポリペプチドを含有してなる腫瘍の診断薬、

15 (30) 受託番号がFERM BP-6818である、細胞傷害性T細胞OK-CTL、ならびに

(31) 前記(30)記載のOK-CTLを用いることを特徴とする、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドの同定法、に関する。

本発明のDNAは、新規な腫瘍抗原タンパク質をコードするものであり、配列
20 番号：1に記載のアミノ酸配列からなるSART-3タンパク質、又は該SART-3のアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなる変異タンパク質、をコードするDNA（ただし、該タンパク質および変異タンパク質は、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）、あるいは、配列番号：
25 2に記載の塩基配列からなるSART-3のDNA、又は該SART-3のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異DNA（ただし、該DNAおよび変異DNAが発現して生産されるタンパク質は、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）が例示される。以下、これら本発明のDNAにつき順次説明する。

1) S A R T - 3 をコードする DNA

前記 DNA のうち、「配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA」、「配列番号：2 に記載の塩基配列からなる DNA」とは、本発明の腫瘍抗原タンパク質 S A R T - 3 をコードする DNA である。該 DNA は、後述の実施例に記載の方法によりクローニングすることができる。また、GenBank Accession No. D63879 において開示されている塩基配列、あるいは本明細書の配列表の配列番号：2 に開示されている塩基配列の適当な部分をハイブリダイゼーションのプロブあるいは P C R のプライマーに用いて、例えば食道癌細胞株 KE-4 (FERM BP-5955) 由来の c D N A ライブラリーをスクリーニングすることなどによっても、クローニングすることができる。該クローニングは、例えば Molecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

2) S A R T - 3 の改変タンパク質またはアレル変異体等をコードする DNA

前記 DNA のうち、「S A R T - 3 のアミノ酸配列のうち 1 もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなる変異タンパク質をコードする DNA」とは、人為的に作製したいわゆる改変タンパク質や、生体内に存在するアレル変異体等のタンパク質をコードする DNA を意味し、この変異タンパク質をコードする DNA は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第 2 版第 1 - 3 巻, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載の種々の方法、例えば部位特異的変異誘発や P C R 法等によって製造することができる。なお、ここで置換、欠失及び／又は付加されるアミノ酸残基の数は、上記部位特異的変異誘発等の周知の方法により置換、欠失及び／又は付加できる程度の数を指す。

3) S A R T - 3 の DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA

前記 DNA のうち、「S A R T - 3 の DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする変異 DNA」とは、例えばラット、マウス等の脊椎動物全ての S A R T - 3 の DNA、または S A R T - 3 の部分タンパク質をコードする DNA のような、配列番号：2 に記載の塩基配列からなるヒト S A R T - 3 の c D N

Aにストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAを指す。

ここで「ストリンジントな条件」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$ ($20\times\text{SSC}$ は、 $333\text{mM Sodium citrate}$ 、 333mM NaCl を示す)、 $0.5\%\text{SDS}$ および 50% ホルムアミドを含む溶液中で 42°C にてハイブリダイズさせた後、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.5\%\text{SDS}$ の溶液中で 68°C にて洗浄するような条件、あるいは、中山ら著、バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎、p. 148-151、秀潤社、1995年、に記載の条件等を指す。

これら変異DNAは、例えば配列番号：2に記載のDNAとのハイブリダイゼーションなどによりクローニングされるものであるが、具体的なcDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、ポジティブコロニーの選択、塩基配列の決定等の操作はいずれも公知であり、先のMolecular Cloning等を参照して行うことができる。ハイブリダイゼーションに用いるプローブとしては、例えば配列番号：2に記載の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

以上1)～3)に挙げたDNAのうち、「そのDNAが発現して生産されるタンパク質が、細胞内分解により、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じる」という特性を有するものが、本発明の腫瘍抗原タンパク質をコードするDNA、すなわち本発明のDNAとなり得る。すなわち、該DNAが発現して生産されるタンパク質の一部のアミノ酸配列からなる部分ペプチドがHLA抗原と結合可能であり、当該ペプチドがHLA抗原と結合して細胞表面に提示された場合、そのペプチドとHLA抗原との複合体に対して特異的なCTLが結合して細胞傷害作用やサイトカインの産生が誘導される、そのようなペプチド断片を生じるものが、本発明のDNAとなり得る。

ここで、候補となるDNAが腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAとなり得るか否かは、例えば以下のような方法により測定することができる。

すなわち、繊維芽細胞VA-13（理化学研究所細胞開発銀行）やアフリカミドリザル腎臓由来のCOS-7（ATCC CRL1651）に対し、候補となるDNAを有する発現プラスミドと、HLA抗原をコードするDNAを有する発現プラスミドとをダブルトランスフェクトする。該トランスフェクトは、例えばリポフェクトアミン試薬（GIBCO BRL社製）を用いたりリポフェクチン法などにより行うことができる。そ

の後、用いたHLA抗原に拘束性の腫瘍反応性のCTLを加えて作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を、例えばELISA法などで測定することによって、候補DNAが本発明のDNAであるか否かを調べることができる。ここで、SART-3はHLA-A24拘束性およびHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチド部分を有するものであるため、前記HLA抗原をコードするDNAとしては、HLA-A24のcDNA（Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995)、Genbank Accession No. M64740）およびHLA-A2のcDNA（Genbank Accession No. M84379）が挙げられ、前記CTLとしては、ヒトの末梢血リンパ球より調製される場合の他、KE-4CTL（FERM BP-5954）などのHLA-A24拘束性のCTL、およびOK-CTL（FERM BP-6818）などのHLA-A2拘束性のCTLが挙げられる。

以上のような本発明のDNAは、医薬の有効成分とすることができる。即ち、本発明のDNAを有効成分として含有する「医薬」は、例えば、本発明のDNAを腫瘍患者に投与することで、腫瘍を治療または予防することができる。

発現ベクターに組み込まれた本発明のDNAを以下の方法により腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞内で腫瘍抗原タンパク質が高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示されることにより、腫瘍特異的CTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療または予防が達成される。

本発明のDNAを投与し細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁、月刊薬事，36(1)，23-48(1994)、実験医学増刊，12(15)，(1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

5 本発明のDNAを実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入する *in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）。*in vivo*法がより好ましい。

10 *in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のDNAを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のDNAを
15 含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）ーリポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

20 製剤中の本発明のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明のDNAを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

25 本発明においてタンパク質とは、上記した本発明の種々のDNAによりコードされるタンパク質であり、その細胞内分解により、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるといふ、腫瘍抗原タンパク質としての特性を有するものを指す。具体例としては、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するSART-3が挙げられる。これら本発明のタンパク質は、前記本発明のDNAを用いることにより、大量に製造することが可能である。

 本発明のDNAを発現して腫瘍抗原タンパク質を生産するには、例えば、前述のMolecular Cloning等の多くの成書や文献に基づいて実施することができる。すなわち、本発明のDNAを適当な発現ベクター（例えばpSV-SPORT1、

pCR3など)に組み込むことにより、宿主細胞内で複製し、機能する発現プラスミドを作製する。次に発現プラスミドを適当な宿主細胞に導入して形質転換体を得る。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、また動物などの多細胞真核生物の細胞などが挙げられる。また、宿主細胞への遺伝子導入法としては、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、電気パルス法、リポフェクチン法などの常法が挙げられる。形質転換体は、適当な培地で培養することによって目的とするタンパク質を生産する。以上のようにして得られた腫瘍抗原タンパク質は、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

以上のようにして作製された本発明の腫瘍抗原タンパク質が活性を有しているか否かは、前記したように、本発明のDNAを細胞内で発現させて本発明のタンパク質を産生させ、該タンパク質の細胞内分解により生じたペプチド断片が腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かを測定することにより、確認することができる。また、得られた腫瘍抗原タンパク質そのものを用いて活性測定を行う場合には、例えばマクロファージなどの食細胞に本発明の腫瘍抗原タンパク質を取り込ませて細胞内でペプチド断片を生じさせ、その後、該ペプチド断片とHLA抗原との複合体に対してCTLを加えて作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン(例えばIFN- γ)の量を測定することなどによって、調べることができる。

以上のような本発明のタンパク質もまた、医薬の有効成分とすることができる。即ち、本発明のタンパク質を有効成分として含有する「医薬」は、例えば、本発明のタンパク質を腫瘍患者に投与することで、腫瘍を治療または予防することができる。当該タンパク質を腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は予防が達成される。

本発明の腫瘍抗原タンパク質を有効成分として含有する医薬は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして

投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原タンパク質の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg~1000mg、好ましくは0.001mg~100mg、より好ましくは0.01mg~10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

本発明において腫瘍抗原ペプチドとは、本発明の腫瘍抗原タンパク質の一部よりなる部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドである。すなわち、前記した本発明の腫瘍抗原タンパク質のアミノ酸配列の一部よりなるペプチドであって、かつ、該ペプチドとHLA抗原との結合複合体がCTLにより認識され得るようなペプチドであれば、本発明のタンパク質のアミノ酸配列中の如何なる位置に存する如何なる長さのペプチドであっても、全て、本発明の腫瘍抗原ペプチドの範疇に含まれる。このような本発明の腫瘍抗原ペプチドは、本発明の腫瘍抗原タンパク質の一部よりなる候補ペプチドを合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かをアッセイすることにより、同定することができる。

ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該公知方法としては文献 (ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ (The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善 (株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

次に、本発明の腫瘍抗原ペプチドの同定方法につき、以下に記述する。

HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのHLAの型について

は、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している（例えばImmunogenetics, 41:p178, 1995などを参照のこと）。例えばHLA-A24のモチーフとしては、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンとなることが知られている（J. Immunol., 152, p3913, 1994, Immunogenetics, 41:p178, 1995, J. Immunol., 155:p4307, 1994）。またHLA-A2のモチーフについては、以下の表1に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41, p178, 1995, J. Immunol., 155:p4749, 1995）。

表 1

HLA-A2のタイプ	N末端から2番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0206	V, Q	V, L
HLA-A0207	L	L

（ペプチドの長さは8～11アミノ酸）

さらに近年、HLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列を、インターネット上、NIHのBIMASのソフトを使用することにより検索することができる

（http://bimas.dcert.nih.gov/molbio/hla_bind/）。

ペプチドの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により（Immunogenetics, 41:178, 1995）、通常8から14アミノ酸程度であることが明らかにされている（ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの抗原ペプチドも認められる）。

これらのモチーフに関わるペプチド部分を本発明の腫瘍抗原タンパク質のアミノ酸配列中から選び出すのは容易である。例えば、腫瘍抗原タンパク質SART-3のアミノ酸配列（配列番号：1）を見れば、上記モチーフ構造に関わるペプチド部分を容易に選び出すことができる。また前記インターネット上での検索により、HLA抗原に結合可能と予想される配列を容易に選び出すことができる。

選り出された候補ペプチドを前述の方法にて合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かを測定することにより、本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

- 5 本発明の腫瘍抗原ペプチドの具体的な同定法としては、例えば J. Immunol., 154, p2257, 1995に記載の方法が挙げられる。すなわち、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原が陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、in vitroで該候補ペプチドを添加して刺激した場合に、該候補ペプチドをパルスしたHLA抗原陽性細胞を特異的に認識するCTLが誘導された場合は、該候補ペプチド
- 10 が腫瘍抗原ペプチドに成り得ることが示される。ここでCTLの誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を、例えばELISA法などによって測定することにより、調べることができる。また ^{51}Cr で標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法（ ^{51}Cr リリースアッセイ、Int. J. Cancer, 58:p317, 1994）によっ
- 15 ても調べることができる。

さらに、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原のcDNAを発現する発現プラスミドを、例えばCOS-7細胞（ATCC No. CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入した細胞に対して候補ペプチドをパルスし、この細胞に対して、前記候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原に拘束性のCTLを反応させ、該CTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を測定することによっても、調べることができる（J. Exp. Med., 187: 277, 1998）。

20

ここで、SART-3はHLA-A24やHLA-A2に拘束性の腫瘍抗原ペプチド部分を有するものである。HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドを選択する場合には、前記HLA抗原をコードするcDNAとしてはHLA-A24のcDNA（Cancer Res., 55: 4248-4252（1995）、Genbank Accession No. M64740）を用い、前記CTLとしては、ヒトの末梢血リンパ球のペプチド刺激により調製される場合の他、KE-4CTL（FERM BP-5954）などのCTLを用いることにより、前記の腫瘍抗原ペプチドの同定を行うことができる。また、HLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドを選択する場合

25

には、HLA-A2のcDNA (Genbank Accession No. M84379) を用い、前記CTLとしては、ヒトの末梢血リンパ球のペプチド刺激により調製される場合の他、OK-CTL (FERM BP-6818) などのCTLを用いることにより、当該腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

- 5 以上のような種々の活性測定の実例は、後述の実施例 4、実施例 6 および実施例 8 に記載されている。

以上のような腫瘍抗原ペプチドの配列の規則性 (モチーフ) が判明している場合と異なり、例えばHLA-A26のようにそのペプチドのモチーフが明らかでない場合は、該HLA-A26と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を認識するCTL株が存在する場合には、例えばW097/46676に記載の方法に準じて本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定
10 することができる。

なお、以上述べたような腫瘍抗原ペプチドの同定法を、以下、“腫瘍抗原ペプチドのアッセイ法”と総称することもある。

前記したように、HLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドの配列には
15 規則性 (モチーフ) があり、具体的には、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンとなることが知られている (J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41: p178, 1995、J. Immunol., 155: p4307, 1994)。
20 また、HLA-A2に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドの配列にも同様の規則性 (モチーフ) があり、具体的には前記表 1 に示したモチーフが知られている (Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155: p4749, 1995)。さらに前記したように、インターネット上、NIHのBIMASのソフトを用いることにより、HLA抗原に結合可能と予想される配列を検索することができる (http://bimas.dcert.nih.gov/molbio/hla_bind/)。
25

従って本発明の腫瘍抗原ペプチドのうち、HLA-A24およびHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしては、配列番号: 1 に記載のSART-3のアミノ酸配列上、このようなモチーフ構造や結合可能と予想される構造に関わる部分ペプチドであって、かつ各HLA抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示

される。

前記HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしては、具体的には、例えば配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドであって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。また、HLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしては、具体的には、例えば配列番号：25～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドであって、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。

すなわち、

1) 配列番号：3～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチド、

2) 配列番号：3～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の全長または連続した一部分を含み、該アミノ酸配列よりN末端方向及び／又はC末端方向に長いペプチド、または配列番号：3～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の連続した一部分よりなるペプチド、

であって、かつ各HLA抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで、前記2)のペプチドの長さとしては、各HLA抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度のものが挙げられる。

本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドの好適なものとしては、配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。すなわち、

1) 配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチド、

2) 配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の全長または連続した一部分を含み、該アミノ酸配列よりN末端方向及び／又はC末端方向に長いペプチド、または配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の連続した一部分よりなるペプチド、であって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチド、

が挙げられる。ここで、前記2)のペプチドの長さとしては、HLA-A24抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度のものが挙げられる。

5 本発明のHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドの好適なものとしては、配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。すなわち、

1) 配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチド、

10 2) 配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列の全長または連続した一部分を含み、該アミノ酸配列よりN末端方向及び／又はC末端方向に長いペプチド、または配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列の連続した一部分よりなるペプチド、であって、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチド、
15 が挙げられる。ここで、前記2)のペプチドの長さとしては、HLA-A2抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度のものが挙げられる。

本発明において「腫瘍抗原ペプチドと機能的に同等の特性を有する誘導体」

(以下、腫瘍抗原ペプチド誘導体と略す場合がある)とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列に対し、1又はそれ以上、好ましくは1～数個のアミノ酸残基の改変を施した改変体であって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての特性を有するものを指す。すなわち、
20 本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列に対して1又はそれ以上のアミノ酸残基の改変を施した改変体であって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するものは、全て、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の範疇に含まれる。

25 ここで、アミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む）を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数および位置は、腫瘍抗原ペプチドとしての活性が維持される限り、任意であるが、前記したように通常、腫瘍抗原ペプチドの長さが

8～14アミノ酸程度であることから、1個から数個の範囲が好ましい。

本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の長さとしては、前記腫瘍抗原ペプチドと同様に8～14アミノ酸程度が好ましい（ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの場合もある。）

5 以上のような本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は、本発明の腫瘍抗原ペプチドの一部を改変した改変体を前記ペプチド合成法に基づき合成し、これを前記腫瘍抗原ペプチドのアッセイ法に供することにより、同定することができる。

10 先に記載したように、HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している。また前記したように、HLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列をインターネット上検索することができる（http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/）。従って、該モチーフ等に基づき、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸を改変した腫瘍抗原ペプチド誘導体を作製することが可能である。

15 例えばHLA-A24に結合して提示される抗原ペプチドのモチーフとしては、前記したように、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンであることが知られている（J. Immunol., 152:p3913, 1994、Immunogenetics, 41:p178, 1995、J. Immunol., 155:p4307, 1994）。またHLA-A2の場合は、前記の表1に記載のモチーフが知られている。またインターネット上でHLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列が示されており（http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/）、例えば前記モチーフ上とり得るアミノ酸に類似の性質を持つアミノ酸が許容され得る。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の例として、本発明の腫瘍抗原ペプチドに対して、これらモチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置（HLA-A24、HLA-A2においては第2位とC末端）にあるアミノ酸を他のアミノ酸（好ましくは前記インターネット上で結合可能と予想されているアミノ酸）に置換したアミノ酸配列の全部又は一部を含むものであって、

20

25

かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得るという活性を持つペプチド誘導体が挙げられる。より好ましくは、該位置において、前記モチーフ上知られたアミノ酸残基の中から置換するアミノ酸残基を選択したアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドであって、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。なお「全部又は一部」の長さとしては、8～14アミノ酸程度の長さが好ましい（ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの場合もある）。

ここで、HLA-A24またはHLA-A2に拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体としては、例えばSART-3のアミノ酸配列上HLA-A24またはHLA-A2の結合モチーフを有するペプチドに対して、前記モチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置、すなわち第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基（好ましくは前記インターネット上で結合可能と予想されているアミノ酸残基）に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられ、好ましくは、第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を前記モチーフ上知られたアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。該HLA-A24またはHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体において「全部又は一部」の長さとしては、8～11アミノ酸程度が好ましい。

具体的には、例えば配列番号：3～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基（好ましくは前記インターネット上で結合可能と予想されているアミノ酸残基）に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示される。好ましくは、配列番号：3～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を前記モチーフ上知られたアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。すなわちHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体に関しては、配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位をチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンに置換し、および／またはC末端をフェニルアラニン、

ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示される。またHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体に関しては、配列番号：25～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位のアミノ酸残基をロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換し、
5 および／またはC末端のアミノ酸残基をバリンまたはロイシンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示される。

本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体の好適なものとしては、配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。
10 より好ましくは、配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位をチロシン、フェニルアラニン、メチオニンあるいはトリプトファンに置換し、および／またはC末端をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、
15 トリプトファンあるいはメチオニンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。このような腫瘍抗原ペプチド誘導体の例を、配列番号：53～配列番号：59に示す。

本発明のHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体の好適なものとしては、配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。
20 より好ましくは、配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位をロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換し、および／またはC末端のアミノ酸残基をバリンまたはロイシンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。このような腫瘍抗原ペプチド誘導体の例を、配列番号：60～配列番号：64に示す。
25

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体は、少なくとも1種または2種以

上組み合わせることにより、腫瘍の治療剤または予防剤として使用することができる。すなわち本発明は、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分として含有する腫瘍の治療剤または予防剤をも提供するものである。本発明の腫瘍の治療剤または予防剤を SART-3 陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞の HLA 抗原に腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体が提示され、提示された HLA 抗原複合体特異的 CTL が増殖して腫瘍細胞を破壊することができ、従って、患者の腫瘍を治療し、又は腫瘍の増殖・転移を予防することができる。SART-3 は、食道癌等の扁平上皮癌等に広範に発現しているので、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤は、適用範囲の広いことが有利である。さらに、前記扁平上皮癌は、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが多いが、本発明の腫瘍の治療剤を併用することにより、治療効果を上げることが可能となる。

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分とする腫瘍の治療剤または予防剤は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常 0.0001mg~1000mg、好ましくは 0.001mg~100mg、より好ましくは 0.01mg~10mg であり、これを数日ないし数月に 1 回投与するのが好ましい。

さらに、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤として、以下に述べるように、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードする DNA の少なくとも 1 種を含有する組換え DNA や、該組換え DNA を発現させて得られうる組換えポリペプチドも、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。

ここで「組換え DNA」とは、例えば、本発明の腫瘍抗原タンパク質の一部よりなる部分ポリペプチド、部分ペプチド、これらの誘導体、またはこれらの連結したポリトープ等をコードする DNA を指し、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたは

その誘導体をコードするDNAを少なくとも一つ含んでさえいれば、本発明の組換えDNAの範疇に含まれる。当該組換えDNAは適当な発現ベクターに組み込むことにより、腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。

ここで「ポリトープ」とは、複数のCTLエピトープを連結させたものであり、
5 当該ポリトープをコードするDNAは近年、DNAワクチンに利用されている
(例えばJ. of Immunology, 160, p1717, 1998などを参照のこと)。本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするDNAの少なくとも1種または2種以上を連結させることにより、さらには所望により他の腫瘍抗原ペプチドをコードするDNAをも連結させることにより、本発明のポリトープをコードするDNA
10 を作製することができる。

本発明の組換えDNAは、DNA合成および通常の遺伝子工学的手法に基づき、
例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press
(1989)等の基本書に従い容易に作製することができる。また、この組換えDNA
の発現ベクターへの組み込みも、前記基本書等に従い行うことができる。

15 作製された本発明の組換えDNAが、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるか否かは、例えば、前記本発明のDNAの活性測定法に準じて行うことができる。また、本発明の組換えDNAを腫瘍の治療剤または予防剤として使用する方法も、前記本発明のDNAに準じて行うことができる。

前記したように、本発明の組換えDNAを発現して得られうる「組換えポリペ
20 プチド」も、腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。

本発明の組換えポリペプチドは、前記した本発明のタンパク質と同様の手法により調製することができる。また、作製された組換えポリペプチドが活性を有するか否かも、前記本発明のタンパク質と同様の手法により測定することができる。さらに、当該組換えポリペプチドを腫瘍の治療剤または予防剤として使用する方
25 法も、前記本発明のタンパク質および本発明のペプチドに準じて行うことができる。

本発明は、本発明のタンパク質、または本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体をも提供するものである。該抗体は、例えば、
Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D.ら編, Cold Spring Harbor

Laboratory Press 出版 New York 1989などに記載の方法により容易に作製される。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体等を用いて常法により適宜動物を免疫することにより、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体等を認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途として、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノブロット法、放射免疫測定法（R I A）、酵素免疫測定法（E L I S A）、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、本発明の腫瘍抗原タンパク質またはそのDNA、あるいは本発明の組換えDNAまたは組換えポリペプチドは、腫瘍患者の治療において、以下のようにイン・ビトロで利用することが可能である。

すなわち、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはそのDNAなどを腫瘍の治療に用いる場合、患者の体内で効率良く特異的なCTLを誘導することの可能な投与法が重要になる。そのための手段のひとつとして、本発明は、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させた抗原提示細胞、および該抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を提供するものである。

ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を提示することの可能なHLA抗原を細胞表面に発現する細胞であれば特に限定されないが、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞から本発明の抗原提示細胞を調製するために添加される物質としては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体のみならず、本発明のDNA、タンパク質、組換えDNAまたは組換えポリペプチドであっても良い。その際、タンパクまたはDNAの形態で使用する場合には細胞内に取り込まれる必要がある。

本発明の抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質または組換えポリペプチドを体外でパルスして、HLA抗原と前記腫瘍抗原ペ

プチドまたはその誘導体との複合体を提示させることにより得られる (Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158, p1796, 1997、Cancer Res., 59, p1184, 1999)。樹状細胞を用いる場合は、例えば、腫瘍患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞を GM-CSF および IL-4 存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明の腫瘍抗原ペプチドまたは腫瘍抗原タンパク質等と共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明の DNA または組換え DNA を導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、当該遺伝子は、DNA の形態であっても、RNA の形態であっても良い。具体的には、DNA の場合は Cancer Res., 56:p5672, 1996 や J. Immunol., 161: p5607, 1998 など を参考にし て行うことができ、また RNA の場合は J. Exp. Med., 184: p465, 1996 など を参考にして行うことができる。

前記抗原提示細胞を有効成分として含有する腫瘍の治療剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このような抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、SART-3 陽性の患者の体内で効率良く特異的な CTL が誘導され、腫瘍を治療することができる。なお、HLA-A24 に陽性の腫瘍患者に対しては HLA-A24 拘束性の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体を使用するといった、患者と使用するペプチドとで HLA の型を合わせる必要のあることは言うまでもない。

さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、本発明の腫瘍抗原タンパク質またはその DNA、あるいは本発明の組換え DNA または組換えポリペプチドのイン・ビトロでの利用法として、以下の養子免疫療法における利用が挙げられる。

すなわちメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤 T 細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている

(J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159、1994)。またマウスのメラノーマにおいては、

脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドTRP-2で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている(J. Exp. Med., 185:453, 1997)。これは、
5 CTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはそのDNA等を用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

すなわち本発明は、前記HLA抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識するCTL、および、該CTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤をも提供するものである。該治療剤は、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このようなCTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の
15 体内に戻すことにより、SART-3陽性の患者の体内でCTLによる腫瘍細胞の傷害作用が促進され、腫瘍細胞を破壊することにより、腫瘍を治療することができる。

本発明の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体、本発明のタンパク質、または本発明の組換えポリペプチドは、腫瘍を診断するための診断薬の成分とすることができる。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体そのものなどを診断薬として用い、腫瘍が疑われる患者から得た試料(例えば血液、腫瘍組織など)中の抗体の存在を検出することにより、腫瘍の早期発見、再発、転移を診断することが可能である。また本発明の腫瘍抗原ペプチド等を有効成分とする医薬の適応可能な腫瘍患者の選択にも利用できる。具体的には、イムノブロット法、
20 RIA、ELISA、蛍光または発光測定法などを用いることにより、当該診断を行うことができる。

さらに近年、抗原ペプチドとHLA抗原との複合体を用いて抗原特異的CTLを検出する新しい検出方法が確立された(Science, 274:p94, 1996)。本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体とHLA抗原との複合体を前記検出方法に供し、

腫瘍抗原特異的CTLを検出することにより、腫瘍の早期発見、再発、転移を診断することができる。また本発明の腫瘍抗原ペプチド等を有効成分とする医薬の適応可能な腫瘍患者の選択や、当該医薬による治療効果の判定などにも利用できる。すなわち本発明においては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体等

5 を含有する、腫瘍の診断薬をも提供するものである。

具体的には、文献 (Science, 274:p94, 1996) に記載の方法に従って蛍光標識したHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体の4量体を作製し、これを用いて腫瘍が疑われる患者の末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的CTLをフローサイトメーターにより定量することにより、前記診断を行うことができる。

10 本発明はまた、結腸癌由来の腫瘍内浸潤リンパ球から樹立されたCTLである、OK-CTL (受託番号 FERM BP-6818) をも提供するものである。当該OK-CTLは、HLA-A2拘束性のCTL株であることが明らかとなっている。従って、OK-CTLを利用することにより、新たな腫瘍抗原タンパク質およびHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドを見出すことができる。具体的には、後述の実施例8を参照されたい。

15

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

参考例1

20 食道癌細胞株に対する細胞傷害性T細胞 (CTL) 株の樹立

中尾ら著, Cancer Res., 55:4248-4252 (1995) の記載に従い、組織型が扁平上皮癌に分類される食道癌細胞株KE-4に対するCTLを患者の末梢血単核球細胞から樹立し、KE-4CTLと命名して以下の実験に使用した。食道癌細胞株KE-4およびKE-4CTLは、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に、それぞれ受託番号FERM BP-5955およびFERM BP-5954で寄託されている (寄託日: いずれも平成9年5月23日)。また、前述の中尾らの報告に従い、KE-4のHLAクラスI分子のタイピングを行い、HLA-A2402、-A2601、-B54、-B60、-Cw1、-Cw3であることを確認した。

25

参考例2

HLA-A2402 cDNAの調製

KE-4から、中尾ら著, Cancer Res., 55:4248-4252(1995)の記載に従い、HLA-A2402 の cDNA (Genbank Accession No. M64740) を発現ベクターpCR3 (INVITROGEN社製) に組み込んだ組換えプラスミドを作製した。

5 参考例 3

KE-4由来 cDNA ライブラリーの作製

KE-4から mRNA 精製システム (ファルマシアバイオテック社製) を用い添付の
プロトコールに従い、全 RNA 画分の分離および oligo(dT) カラムによる
poly(A)⁺ mRNA の調製を行った。mRNA よりスーパースクリプトプラスミ
10 ドシステム (GIBCO BRL 社製) を用い添付のプロトコールに従い、両端に NotI アダ
プターと SalI アダプターを連結した cDNA を作製した後、この cDNA を発現
ベクターのプラスミド pSV-SPORT1 (GIBCO BRL 社製) の制限酵素 NotI および SalI
の切断部位にライゲーションにより連結して組換えプラスミドを得た。この組換
えプラスミドをジーンパルサー (Bio-Rad 社製) を用いて 25 μ F, 2.5kV の条件で、
15 電気パルスにより大腸菌のエレクトロマックス DH10BTM セル (GIBCO BRL 社製) に
導入し、アンピシリン (50 μ g/ml) を含む LB 培地 (1% バクトトリプトン、0.5% イ
ーストエキス、0.5% NaCl、pH7.3) で組換えプラスミドが導入されている形質転換
体を選択した。

実施例 1

20 新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子のスクリーニング

参考例 3 に示した形質転換体の約 100 個のプールからの組換えプラスミド DNA
A の回収は以下のように行った。すなわち、アンピシリン (50 μ g/ml) を含む LB
培地の入った 96 ウェル U 底マイクロプレートに、ウェルあたり 100 個の形質転
換体を加え培養後、その一部をウェルあたり 0.25ml の TYGPN 培地 (F. M. Ausubel ら
25 編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.) の入
った別の 96 ウェル U 底マイクロプレートに移して 37°C で 48 時間培養し、残りの LB
培地のマイクロプレートは凍結保存した。TYGPN 培地で培養した形質転換体の組
換えプラスミド DNA は、マイクロプレートでアルカリ溶解法 (F. M. Ausubel ら
編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.) によ

り調製した。イソプロパノール沈澱で回収した組換えプラスミドDNAは、50 μ lの20ng/ml RNaseを含む10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.4溶液で懸濁した。

5 線維芽細胞株のVA-13 細胞(理化学研究所細胞開発銀行、Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 44:242-254, 1966)へ、リポフェクチン法により以下のようにKE-4 c DNAの組換えプラスミドとHLA-A2402 c DNAの組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした。すなわち、VA-13細胞を96ウェル平底マイクロプレートにウェル当たり7000個を加えて、100 μ lの10% FCSを含むRPMI 1640培養液で2日間培養した。リポフェクチン試薬(GIBCO BRL社製)を用い、形質転換体約 100個分のKE-4 c DNAの組換えプラスミド25 μ lと参考例2に示したHLA-A2402 c DNAの組換えプラスミド10 μ l (200ng)と約35倍に希釈したリポフェクチン試薬35 μ lの混合液70 μ lのうちの30 μ l をVA-13細胞に加えてダブルトランスフェクトした。トランスフェクタントは2点ずつ用意した。5時間後、このトランスフェクタントに200 μ lの10% FCSを含む培養液を加え、更に72時間、37℃で培養した後、培養液を除去し、ウェル当たり10000個のKE-4CTLを加えて100 μ lの10%FCSと
10 25U/mlのIL-2を含む培養液で37℃で24時間培養した。培養液を回収し、以下のELISA法にてIFN- γ 量を測定した。
15

すなわち、96ウェルマイクロプレートに固着化抗体として抗ヒトIFN- γ マウスモノクローナル抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミンで非特異的結合をブロックした後、検体中のIFN- γ を抗体に結合させた。次に検出抗体として抗ヒトIFN- γ
20 ウサギポリクローナル抗体を結合させ、さらにアルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギイムノグロブリンヤギ抗体を結合した後、発色基質としてパラニトロフェニルフォスフェートを反応させ、1N NaOHを等量加えて反応を停止させた後、吸光度(405nm)を測定した。これをスタンダードのIFN- γ で得られた値と比較することにより定量した。

25 高いIFN- γ 産生が認められた群については、該当する凍結保存してあったKE-4 c DNAの組み換えプラスミドによる形質転換体約 100個のプールを用いてさらに以下のようにスクリーニングを行った。すなわち、形質転換体のプールをアンピシリン(50 μ g/ml)を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロニーを得て、各群200コロニーについてウェル当たりの形質転換体が1種類となる条件で上記と

同様の方法で培養し、KE-4 c DNAの組換えプラスミドDNAを調製した。さらに上記と同様な方法で VA-13細胞へのKE-4 c DNAの組換えプラスミドとHLA-A2402 c DNAの組換えプラスミドのダブルトランスフェクトを行い、引き続いてKE-4CTLとの混合培養を行い、KE-4CTLが反応して産生した培養液中のIFN- γ の定量を行って陽性のプラスミドを選択した。この操作によりKE-4 c DNA組換えプラスミドクローンが選択され、クローン13と命名した。解析の結果、クローン13には、約1.2 k b の c DNA が組み込まれていた。クローン13については、さらにもう一度、同様な操作を繰り返してKE-4CTLによるIFN- γ の産生量を上記と同様の方法により定量した。その結果を以下の表2に示す。

表 2

標的細胞	KE-4CTLが産生したIFN- γ 量 (pg/ml)
VA-13 + HLA-A2402	326
VA-13 + HLA-A2402 + クローン13	775

KE-4CTLは、VA-13にHLA-A2402のみをトランスフェクトした細胞に対してよりも、VA-13にHLA-A2402とクローン13をダブルトランスフェクトした細胞に対して、より強く反応してIFN- γ を産生した。この結果から、クローン13がコードするタンパク質は、腫瘍抗原タンパク質であることが示された。

実施例 2

腫瘍抗原タンパク質をコードする全長の c DNA クローンのクローニング

実施例 1 で得られたクローン13に組込まれた c DNA の遺伝子の全長の長さを調べるために、以下のノーザンハイブリダイゼーションを行った。

まず食道癌細胞株KE-4より、RNAzol B (TEL-TEST, INC. 社製) を用いて RNA を調製した。5 μ g の RNA をホルムアミド、ホルムアルデヒド存在下で変性させ、アガロース電気泳動を行った後、Hybond-N+ ナイロンメンブレン (Amersham 社製) に転写、固定した。マルチプライム DNA ラベリングシステム (Amersham 社製) により、クローン13の挿入配列部分を³²P で標識して DNA プローブを製し、公知の方法 (中山ら著、バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎、p. 148-151、秀潤社、1995年) に従って、メンブレン上の RNA にハイブリダイズさせた後、オートラジオグラフィーにより、クローン13に組込まれた c

DNAに対応するmRNAを検出した。この結果より、mRNAの全長は約3.8 kbであることが明らかになったため、先に得られたクローン13を含む全長のcDNAクローンのクローニングを行った。参考例3に示したKE-4由来cDNAライブラリーをアンピシリン (50 μ g/ml) を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロニーを得た後、Hybond-N+ ナイロンメンブレン (Amersham社製) に添付のプロトコールに従って、コロニーのDNAを転写、固定した。クローン13の挿入配列部分を³²Pで標識したDNAプローブを用い、上述のノーザンハイブリダイゼーションと同様の条件でハイブリダイゼーションとオートラジオグラフィを行って、陽性を示す形質転換体のコロニーを選択した。さらに、選択された複数のコロニーより組換えプラスミドを回収し、制限酵素Not I及びSal Iで処理した後、アガロース電気泳動により組み込まれたcDNAの長さを確認した。約3.8 kbのcDNAが組み込まれた組換えプラスミドを選択し、これをクローンKと命名した。次に、実施例1と同様な方法により、腫瘍抗原タンパク質遺伝子のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドクローンKと、HLA-A2402のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドとをVA-13細胞にダブルトランスフェクトした細胞を標的細胞として、KE-4CTLが反応して産生したIFN- γ 量を定量した。その結果を以下の表3に示す。

表3

標的細胞	KE-4CTLが産生したIFN- γ 量 (pg/ml)
VA-13 + HLA-A2402	342
VA-13 + HLA-A2402 + クローンK	627

KE-4CTLは、VA-13にHLA-A2402のみをトランスフェクトした細胞に対してよりも、VA-13にHLA-A2402とクローンKをダブルトランスフェクトした細胞に対して、より強く反応してIFN- γ を産生した。この結果から、クローンKがコードするタンパク質は腫瘍抗原タンパク質であることが示された。このクローンKがコードする腫瘍抗原タンパク質を、SART-3 (squamous cell carcinoma antigens recognized by T cells-3) と命名した。

実施例3

腫瘍抗原タンパク質遺伝子の塩基配列の決定

実施例 2 で得られた腫瘍抗原タンパク質SART-3をコードするDNAについて、DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencingキット（パーキンエルマー社製）を使用して、その塩基配列を決定した。決定されたSART-3の塩基配列を、配列表の配列番号：2に示す。該cDNAの全長は3798塩基対であった。配列番号：2によってコードされるSART-3のアミノ酸配列（963アミノ酸）を、配列番号：1に示す。配列番号：2に記載した塩基配列を、GenBankデータベースを使用して既知の配列と比較した結果、腫瘍抗原タンパク質SART-3の塩基配列は、GenBank Accession No. D63879として登録されている機能不明の遺伝子KIAA0156と、1塩基（KIAA0156の第108位）相違する新規な塩基配列を有していた。

実施例 4

候補ペプチドの選択

HLA分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、HLA-A24の場合、8～11アミノ酸よりなるペプチドの第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンあるいはトリプトファン、またC末端がフェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシンあるいはメチオニンがモチーフとなることが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J. Immunol., 152:3913, 1994、J. Immunol., 155:4307, 1994）。このようなモチーフに従い、配列番号：1に記載の腫瘍抗原タンパク質SART-3のアミノ酸配列から、上記モチーフを有する8～11アミノ酸よりなるペプチド部分を選択した。当該ペプチドの例を配列番号：3～配列番号：24に示す。これらのペプチドを（株）バイオロジカに依頼し、Fmoc法にて合成を行った。

次にHLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドを文献（J. Exp. Med., 187:277, 1998）の記載に従い、 1.8×10^4 個のVA-13細胞にリポフェクシン法にてトランスフェクションしてHLA-A2402を発現させた。この細胞に対し、先に合成したHLA-A24の結合モチーフを有する各種ペプチドをそれぞれ $10 \mu\text{M}$ で2時間添加してパルスした後、 2×10^4 個のKE-4CTLとともに18時間培養し、KE-4CTLが産生した培養上清中のIFN- γ 量をELISA法にて測定した。7種のペプチド、すなわち腫瘍抗原タンパク質SART-3のアミノ酸配列の第109位から第118位の配列よりなるペプチド「109-118」（配列番号：3）、第172位から第181位の配列よりなるペプチド

- 「172-181」 (配列番号：4)、第284位から第292位の配列よりなるペプチド
 「284-292」 (配列番号：5)、第315位から第323位の配列よりなるペプチド
 「315-323」 (配列番号：6)、第416位から第425位の配列よりなるペプチド
 「416-425」 (配列番号：7)、第426位から第434位の配列よりなるペプチド
 5 「426-434」 (配列番号：8)、及び第448位から第456位の配列よりなるペプチド
 「448-456」 (配列番号：9) を用いて上記の実験を行った結果を表4に示す。

表 4

	ペプチド	上清中のIFN- γ (pg/ml)
	「109-118」	928
10	「172-181」	830
	「284-292」	794
	「315-323」	880
	「416-425」	731
	「426-434」	833
15	「448-456」	754
	なし	677

KE-4CTLは、ペプチドをパルスしていない細胞に対してよりも、ペプチドをパルスした細胞に対して強く反応してIFN- γ を産生した。この結果から、これら7種のペプチドは腫瘍抗原ペプチドとして機能することが示された。

20 実施例 5

腫瘍抗原ペプチドの合成

前記7種のペプチドについて、以下のように固相法により合成を行った。

(1) SART-3 「109-118」 Val-Tyr-Asp-Tyr-Asn-Cys-His-Val-Asp-Leu (配列番号：3) の合成

- 25 樹脂はFmoc-Leu-Alko Resin (0.55mmol/g、100-200mesh) を用いた。この樹脂100mgを用いて、後記スケジュール1に従って合成を開始し、Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, F

moc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OHを順次カップリングさせた。カップリングの後スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

5 このペプチド樹脂にReagent K (5%フェノール、5%チオアニソール、5% H_2O 、2.5%エタンジチオール/TFA溶液) 2mlを加え、室温で2.5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム (30 ϕ ×250mm)
10 に注入し、カラムを0.1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を180分で25%まで増加させ、流速7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Val-Tyr-Asp-Tyr-Asn-Cys-His-Val-Asp-Leu 31.0mg
15 を得た。

得られたVal-Tyr-Asp-Tyr-Asn-Cys-His-Val-Asp-Leuは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム (4.6 ϕ ×250mm) を用いた、16%から46%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間19.3分を示し、そのアミノ酸分析値 (ただし、Cysは検出せず) および質量分析値は理論値と一致した。
20

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、8時間

分析法：ニンヒドリン法

25

*基準アミノ酸 () 内理論値

Asx : 2.77 (3)

Val : 1.70 (2)

*Leu : 1.00 (1)

Tyr : 1.98 (2)

His : 0.91 (1)

質量分析 (FAB)

[M+H]⁺ : 1241

5 表 5

スケジュール 1

工程	時間 (分) × 処理回数
1. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 2
2. (脱保護) 50%ピペリジン/DMF	12 × 1
10 3. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 7
4. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) /NMP溶液 0.9 ml、DIC (5当量) /NMP 溶液 0.3 ml	30 × 1
5. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 2
15 6. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) /NMP溶液 0.9 ml、DIC (5当量) /NMP 溶液 0.3 ml	30 × 1
7. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 4
(2) SART-3 「172-181」 Leu-Phe-Glu-Lys-Ala-Val-Lys-Asp-Tyr-Ile (配列番号: 4) の合成	

20

前記 (1) と同様にして、Fmoc-Ile-Alko Resin (0.4 mmol/g、100-200 mesh) 100mg を用いて、Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH を順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め 0.1% TFA 水で平衡化させた逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-A カラム (30φ × 250 mm) に注入し、カラムを 0.1% TFA 水で洗浄後、アセトニトリル濃度を

25

300分で30%まで増加させ、流速7ml/min.で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Leu-Phe-Glu-Lys-Ala-Val-Lys-Asp-Tyr-Ile 66.3mgを得た。

- 5 得られたLeu-Phe-Glu-Lys-Ala-Val-Lys-Asp-Tyr-Ileは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム(4.6φ×250mm)を用いた、12%から42%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間23.8分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

10

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、12時間

分析法：ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

	Asx : 0.94 (1)
15	Glx : 1.03 (1)
	Ala : 1.00 (1)
	Val : 0.88 (1)
	Ile : 0.92 (1)
	*Leu : 1.00 (1)
20	Tyr : 0.96 (1)
	Phe : 0.97 (1)
	Lys : 1.45 (2)

質量分析 (FAB)

25

[M+H]⁺ : 1225

(3) SART-3 「284-292」 Asn-Tyr-Asn-Lys-Ala-Leu-Gln-Gln-Leu (配列番号：5) の合成

前記(1)と同様にして、Fmoc-Leu-Alko Resin 100mgを用いて、Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-

Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-Asn-OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1% TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム (30φ×250mm) に注入し、カラムを0.

1% TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を300分で30%まで増加させ、流速7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Asn-Tyr-Asn-Lys-Ala-Leu-Gln-Gln-Leu 25.0mgを得た。

得られたAsn-Tyr-Asn-Lys-Ala-Leu-Gln-Gln-Leuは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム (4.6φ×250mm) を用いた、12%から42%までの0.1% TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間19.0分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：1% フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、12時間

分析法：ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

Asx : 1.87 (2)

Glx : 2.03 (2)

Ala : 0.98 (1)

*Leu : 2.00 (2)

Tyr : 0.99 (1)

Lys : 0.97 (1)

質量分析 (FAB)

[M+H]⁺ : 1091

(4) SART-3 「315-323」 Ala-Tyr-Ile-Asp-Phe-Glu-Met-Lys-Ile (配列番号：6) の合成

前記(1)と同様にして、Fmoc-Ile-Alko Resin (0.6
2mmol/g、100-200mesh) 100mgを用いて、Fmoc-Lys
(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH,
Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH,
5 Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチド
を酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-
PACK ODS-Aカラム(30φ×250mm)に注入し、カラムを0.
1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を180分で40%まで増加させ、
10 流速7ml/min.で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物
を含む画分を集め、凍結乾燥し、Ala-Tyr-Ile-Asp-Phe-Glu-Met-Lys-Ile 15.4mgを得た。

得られたAla-Tyr-Ile-Asp-Phe-Glu-Met-Lys-Ileは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム(4.6φ×
15 250mm)を用いた、21%から51%までの0.1%TFAを含むアセトニ
トリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間19.6分を示し、そ
のアミノ酸分析値(ただし、Metは検出せず)および質量分析値は理論値と一
致した。

アミノ酸分析

20 加水分解: 1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、8時間

分析法: ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

Asx : 0.91 (1)
Glx : 1.06 (1)
25 Ala : 1.06 (1)
Ile : 1.69 (2)
Tyr : 0.81 (1)
*Phe : 1.00 (1)
Lys : 0.87 (1)

質量分析 (FAB)

[M+H]⁺: 1130

5 (5) SART-3 「416-425」 Asp-Tyr-Val-Glu-Ile-Trp-Gln-Ala-Tyr-Leu (配列番号: 7) の合成

前記 (1) と同様にして、Fmoc-Leu-Alko Resin 100 mg を用いて、Fmoc-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Trp (Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu (OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-Asp (OtBu)-OH を順次
10 カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め 0.1% TFA 水で平衡化させた逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-A カラム (30φ×250mm) に注入し、カラムを 0.1% TFA 水で
15 洗浄後、アセトニトリル濃度を 180 分で 35% まで増加させ、流速 7 ml/min. で溶出した。溶出液を A220 nm でモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Asp-Tyr-Val-Glu-Ile-Trp-Gln-Ala-Tyr-Leu 18.9 mg を得た。

得られた Asp-Tyr-Val-Glu-Ile-Trp-Gln-Ala-Tyr-Leu は、逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-AM カラム (4.6φ×250mm) を用いた、25% から 55% までの 0.1% TFA を含む
20 アセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間 20.5 分を示し、そのアミノ酸分析値 (ただし、Trp は検出せず) および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

25 加水分解: 1% フェノール / 6N 塩酸水溶液、110℃、10 時間
分析法: ニンヒドリン法

* 基準アミノ酸 () 内理論値

Asx: 1.00 (1)

Glx: 2.09 (2)

Ala : 1.04 (1)
Val : 0.89 (1)
Ile : 0.86 (1)
*Leu : 1.00 (1)
5 Tyr : 1.95 (2)

質量分析 (FAB)

 $[M+H]^+ : 1300$

10 (6) SART-3 「426-434」 Asp-Tyr-Leu-Arg-Arg-Arg-Val-Asp-Phe (配列番号: 8) の合成

前記 (1) と同様にして、Fmoc-Phe-Alko Resin (0.72 mmol/g, 100-200 mesh) 100mg を用いて、Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH を順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め 0.1% TFA 水で平衡化させた逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-A カラム (30φ × 250mm) に注入し、カラムを 0.1% TFA 水で洗浄後、アセトニトリル濃度を 240 分で 25% まで増加させ、流速 7 ml/min. で溶出した。溶出液を A220nm でモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Asp-Tyr-Leu-Arg-Arg-Arg-Val-Asp-Phe 34.0mg を得た。

25 得られた Asp-Tyr-Leu-Arg-Arg-Arg-Val-Asp-Phe は、逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-AM カラム (4.6φ × 250mm) を用いた、12% から 42% までの 0.1% TFA を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間 20.1 分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解: 1% フェノール / 6N 塩酸水溶液、110℃、12時間

分析法：ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

A s x : 1. 9 0 (2)

V a l : 0. 9 5 (1)

5 * L e u : 1. 0 0 (1)

T y r : 1. 0 0 (1)

P h e : 0. 9 9 (1)

A r g : 2. 9 3 (3)

10

質量分析 (FAB)

[M+H]⁺ : 1 2 3 9

(7) SART-3 「448-456」 Ala-Phe-Thr-Arg-Ala-Leu-Glu-Tyr-Leu (配列番号: 9) の合成

15

前記 (1) と同様にして、Fmoc-Leu-Alko Resin 100 mg を用いて、Fmoc-Tyr (tBu) -OH, Fmoc-Glu (OtBu) -OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg (Pmc) -OH, Fmoc-Thr (tBu) -OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ala-OH を順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め 0. 1 % TFA 水で平衡化させた逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-A カラム (30 φ × 250 mm) に注入し、カラムを 0. 1 % TFA 水で洗浄後、アセトニトリル濃度を 240 分で 30 % まで増加させ、流速 7 ml / min. で溶出した。溶出液を A220 nm でモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Ala-Phe-Thr-Arg-Ala-Leu-Glu-Tyr-Leu 22. 8 mg を得た。

20

25

得られた Ala-Phe-Thr-Arg-Ala-Leu-Glu-Tyr-Leu は、逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-AM カラム (4. 6 φ × 250 mm) を用いた、20 % から 50 % までの 0. 1 % TFA を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間 18. 1 分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール／6N塩酸水溶液、110℃、12時間

分析法：ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

5	Th r : 0. 9 1	(1)
	G l x : 1. 0 3	(1)
	A l a : 1. 9 1	(2)
	* L e u : 2. 0 0	(2)
	T y r : 1. 0 0	(1)
10	P h e : 0. 9 7	(1)
	A r g : 0. 9 7	(1)

質量分析 (F A B)

[M+H]⁺ : 1 0 8 3

15 実施例 6

腫瘍抗原ペプチド及びその誘導体による末梢血リンパ球からのCTL誘導

実施例 5 で合成した「109-118」(配列番号：3) 及び「315-323」(配列番号：6) のペプチドを用いて、末梢血リンパ球から抗原特異的なCTLが誘導できるか検討した。

20 HLA-AローカスがA24のヘテロである健常人2名(それぞれHD1、HD2と表記する)の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離した。24穴プレートに2×10⁶細胞/穴となるようにリンパ球を加え、リンパ球培養液で培養した。培養液に前記腫瘍抗原ペプチドを10μMになるように加え、末梢血リンパ球を刺激した。1週間後、X線照射(50Gy)した約2×10⁵個の末梢血リンパ球と

25 とともに前記腫瘍抗原ペプチドを10μMになるように加えて、2回目の刺激を行った。さらに1週間後、3回目の刺激を同様に繰り返した。3回目の刺激から1週間後、培養したリンパ球を回収した。SART-3を発現しておりHLA-A2402陽性のT細胞白血病細胞株であるMT-2、及びSART-3を発現しているがHLA-A2402陰性のT細胞白血病細胞株であるRPMI8402をそれぞれ標的細胞(1

× 10⁴個)として、前記のリンパ球 (8×10⁴個) が反応して産生する培養上清中の IFN- γ 量を、実施例 1 と同様の ELISA 法にて測定した。結果を表 6 に示す。

表 6

5

抗原ペプチド	上清中の IFN- γ (pg/ml)			
	HD1		HD2	
	MT-2	RPMI8402	MT-2	RPMI8402
「109-118」	1771	159	2078	28
「315-323」	2041	26	974	40
なし	552	154	413	69

10

「109-118」及び「315-323」のペプチドで刺激した末梢血リンパ球は、HLA-A24陽性のMT-2に反応したが、HLA-A24陰性のRPMI8402には反応しなかったことから、HLA-A24拘束性の抗原ペプチド特異的なCTLが誘導されていることが示された。

15

なお本実験で用いたMT-2の代わりに、HLA-A24のcDNA発現プラスミドをCOS-7細胞 (ATCC No. CRL1651) やVA-13細胞 (理化学研究所細胞銀行) に導入してペプチドをパルスした細胞を用いることによっても、同様の実験を行うことが可能である (J. Exp. Med., 187:277, 1998)。

実施例 7

大腸癌由来の腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) からの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 株の樹立

20

S 状結腸癌患者手術検体 (HLA-A0207陽性) のTILを24穴プレートを用い、45% RPMI、45%AIM-V (GIBCO BRL社製)、10%FCSに、100U/mlインターロイキン-2、0.1mM NEAA (GIBCO BRL社製) を添加した培養液 (以下、リンパ球培養液と呼ぶ) で培養した。培養開始から2日間は、培養液中に抗CD3抗体のNU-T3 (ニチレイ社製) を1 μ g/ml添加した。30日以上培養を続け、HLA-A2拘束性のCTL株を樹立し、これをOK-CTLと命名した。OK-CTLは、茨城県つくば市東一丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている (微生物の表示: OK-CTL; 受領日: 平成11年8月3日; 受託番号: FERM BP-6818)。

25

次に、SW620細胞 (ATCC株番号CCL-227) から中尾ら著, Cancer. Res., 55:4248, 1995の記載に従い、HLA-A0201のcDNA (Genbank Accession No. M84379) を発現ベ

クターpCR3 (INVITROGEN社製) に組込んだ組換えプラスミドを作製した。実施例 1 と同様のリポフェクション法により、アフリカミドリザルの腎臓由来の細胞株 COS-7 (ATCC番号CRL1651) (1×10^4 個) へSART-3遺伝子のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドクローンKとHLA-A0201のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした細胞を標的細胞として、 5×10^4 個のOK-CTLが反応して産生したIFN- γ 量をELISA法にて定量した。また、対照群として、トランスフェクトしない無処理群、組換えプラスミドクローンKとHLA-A2402のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした群を設定した。その結果を以下の表 7 に示す。

表 7

標的細胞	OK-CTLが産生したIFN- γ 量 (pg/ml)
COS-7	653
COS-7 + HLA-A0201 + K	2401
COS-7 + HLA-A2402 + K	600

SART-3遺伝子のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドクローンKとHLA-A0201のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした場合、OK-CTLは他の群に比べ強く反応して、IFN- γ を産生した。このことから、HLA-A0201 に腫瘍抗原タンパク質SART-3の抗原ペプチドが提示され、これをOK-CTLが認識すること、すなわちSART-3にはHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドの存在していることが明らかになった。

実施例 8

HLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドの同定

配列番号：1 に記載の腫瘍抗原タンパク質SART-3のアミノ酸配列からHLA-A0201に結合可能と予想される9または10アミノ酸よりなるペプチドを、インターネットによりNIHのBIMASのソフト (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) を用いて検索した。検索されたペプチドの例を配列番号：25～配列番号：52に示す。これらのペプチドを(株)バイオロジカに依頼し、Fmoc法にて合成を行った。

次に、HLA-A0201陽性であるが内因性ペプチド提示能が欠損しているT-Bハイブリドーマ細胞株のT2細胞（Immunogenetics, 21:235, 1985） 1×10^4 個に対し、先に合成したHLA-A0201に結合可能と予想されるペプチドをそれぞれ $10 \mu\text{M}$ で2時間パルスした後、 6×10^4 個のOK-CTLとともに18時間培養し、OK-CTLが産生した培養上清中のIFN- γ 量をELISA法にて定量した。5種類のペプチド、すなわち腫瘍抗原タンパク質SART-3のアミノ酸配列の第152位から第160位の配列よりなるペプチド「152-160」（配列番号：25）、第249位から第257位の配列よりなるペプチド「249-257」（配列番号：26）、第302位から第310位よりなるペプチド「302-310」（配列番号：27）、第309位から第317位よりなるペプチド「309-317」（配列番号：28）、及び第386位から第394位よりなるペプチド「386-394」（配列番号：29）を用いて上記の実験を行った結果を表8に示す。

表 8

ペプチド	上清中のIFN- γ (pg/ml) *
「152-160」	162
「249-257」	209
「302-310」	190
「309-317」	231
「386-394」	122

*) ペプチドをパルスしていないT2細胞に対するIFN- γ 産生量を差し引いた値

OK-CTLは、ペプチドをパルスしていない細胞に対してよりも、ペプチドをパルスした細胞に対して強く反応してIFN- γ を産生した。この結果から、これら5種類のペプチドはHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドとして機能することが示された。

なお本実験で用いたT2細胞の代わりに、HLA-A0201のcDNA発現プラスミドをCOS-7細胞（ATCC No. CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入した細胞を用いることによっても、同様の実験を行うことが可能である

（J. Exp. Med., 187:277, 1998）。

配列表フリーテキスト

配列番号：53に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラ

ニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第10番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

5 配列番号：54に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第10番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

10 配列番号：55に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

15 配列番号：56に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

配列番号：57に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第10番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

20 配列番号：58に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

25 配列番号：59に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

配列番号：60に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸

は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：61に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

- 5 配列番号：62に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

- 10 配列番号：63に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：64に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

産業上の利用の可能性

- 15 本発明により、新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれら腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、腫瘍抗原ペプチドまたはこれらの誘導体を、in vivoまたはin vitroで利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬などを提供することができる。

請 求 の 範 囲

5 1. 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなる変異タンパク質、をコードするDNA（ただし、該タンパク質および変異タンパク質は、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）。

10 2. 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA、又はそのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異DNA（ただし、該DNAおよび変異DNAが発現して生産されるタンパク質は、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）。

3. 請求項1または2記載のDNAを有する発現プラスミド。

4. 請求項3記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体。

15 5. 請求項4記載の形質転換体を培養し、発現される組換えタンパク質を回収することからなる、組換えタンパク質の生産方法。

6. 請求項1または2記載のDNAによりコードされるか、または請求項5記載の生産方法により生産される、腫瘍抗原タンパク質。

20 7. 請求項1または2記載のDNA、あるいは請求項6記載のタンパク質を有効成分として含有する医薬。

8. 請求項1または2記載のDNA、あるいは請求項6記載のタンパク質を有効成分として含有する、腫瘍の治療剤または予防剤。

25 9. 請求項6記載のタンパク質の一部よりなる部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

10. HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A2である請求項9記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

11. 配列番号：3～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項10記載の腫瘍抗原ペプチド、ま

たは機能的に同等の特性を有するその誘導体。

1 2. 配列番号：3～配列番号：9、または配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項1記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

1 3. 配列番号：3～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項1記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

1 4. 配列番号：3～配列番号：9、または配列番号：25～配列番号：29のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項1記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

1 5. 配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンに置換され、および／またはC末端のアミノ酸残基がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項1記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

1 6. 配列番号：25～配列番号：52のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位がロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換され、および／またはC末端のアミノ酸残基がバリンまたはロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項1記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

1 7. 配列番号：53～配列番号：64のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項1記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

1 8. 請求項9～17いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも1種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤。

19. 請求項9～17いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするDNAの少なくとも1種を含有する組換えDNA。

20. 請求項19記載の組換えDNAを発現させて得られうる組換えポリペプチド。

5 21. 請求項19記載の組換えDNAまたは請求項20記載の組換えポリペプチドを有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤。

22. 請求項6記載のタンパク質、請求項9～17いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、のいずれかに特異的に結合する抗体。

10 23. 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA抗原と請求項9～17いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞。

15 24. 請求項1または2記載のDNA、請求項6記載の腫瘍抗原タンパク質、請求項19記載の組換えDNA、あるいは請求項20記載の組換えポリペプチドを、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込ませて得られうる、HLA抗原と腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体の提示された抗原提示細胞。

25. 請求項23または24記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

20 26. HLA抗原と請求項9～17いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞。

27. 請求項23または24記載の抗原提示細胞に提示されたHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞。

25 28. 請求項26または27記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

29. 請求項9～17いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、請求項6記載のタンパク質、あるいは請求項20記載の組換えポリペプチドを含有してなる腫瘍の診断薬。

30. 受託番号がFERM BP-6818である、細胞傷害性T細胞OK-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CTL。

31. 請求項30記載のOK-CTLを用いることを特徴とする、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドの同定法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/32

Thr Lys Val Arg Met Ala Arg Gln Lys Met Ser Glu Ile Phe Pro Leu
130 135 140

Thr Glu Glu Leu Trp Leu Glu Trp Leu His Asp Glu Ile Ser Met Ala
145 150 155 160

5 Gln Asp Gly Leu Asp Arg Glu His Val Tyr Asp Leu Phe Glu Lys Ala
165 170 175

Val Lys Asp Tyr Ile Cys Pro Asn Ile Trp Leu Glu Tyr Gly Gln Tyr
180 185 190

Ser Val Gly Gly Ile Gly Gln Lys Gly Gly Leu Glu Lys Val Arg Ser
10 195 200 205

Val Phe Glu Arg Ala Leu Ser Ser Val Gly Leu His Met Thr Lys Gly
210 215 220

Leu Ala Leu Trp Glu Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Ser Ala Ile Val Glu
225 230 235 240

15 Ala Ala Arg Leu Glu Lys Val His Ser Leu Phe Arg Arg Gln Leu Ala
245 250 255

Ile Pro Leu Tyr Asp Met Glu Ala Thr Phe Ala Glu Tyr Glu Glu Trp
260 265 270

Ser Glu Asp Pro Ile Pro Glu Ser Val Ile Gln Asn Tyr Asn Lys Ala
20 275 280 285

Leu Gln Gln Leu Glu Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gln
290 295 300

Ala Glu Ala Pro Arg Leu Ala Glu Tyr Gln Ala Tyr Ile Asp Phe Glu
305 310 315 320

25 Met Lys Ile Gly Asp Pro Ala Arg Ile Gln Leu Ile Phe Glu Arg Ala
325 330 335

Leu Val Glu Asn Cys Leu Val Pro Asp Leu Trp Ile Arg Tyr Ser Gln
340 345 350

Tyr Leu Asp Arg Gln Leu Lys Val Lys Asp Leu Val Leu Ser Val His

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/32

	355	360	365
	Asn Arg Ala Ile Arg Asn Cys Pro Trp Thr Val Ala Leu Trp Ser Arg		
	370	375	380
	Tyr Leu Leu Ala Met Glu Arg His Gly Val Asp His Gln Val Ile Ser		
5	385	390	395 400
	Val Thr Phe Glu Lys Ala Leu Asn Ala Gly Phe Ile Gln Ala Thr Asp		
	405	410	415
	Tyr Val Glu Ile Trp Gln Ala Tyr Leu Asp Tyr Leu Arg Arg Arg Val		
	420	425	430
10	Asp Phe Lys Gln Asp Ser Ser Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Ala		
	435	440	445
	Phe Thr Arg Ala Leu Glu Tyr Leu Lys Gln Glu Val Glu Glu Arg Phe		
	450	455	460
	Asn Glu Ser Gly Asp Pro Ser Cys Val Ile Met Gln Asn Trp Ala Arg		
15	465	470	475 480
	Ile Glu Ala Arg Leu Cys Asn Asn Met Gln Lys Ala Arg Glu Leu Trp		
	485	490	495
	Asp Ser Ile Met Thr Arg Gly Asn Ala Lys Tyr Ala Asn Met Trp Leu		
	500	505	510
20	Glu Tyr Tyr Asn Leu Glu Arg Ala His Gly Asp Thr Gln His Cys Arg		
	515	520	525
	Lys Ala Leu His Arg Ala Val Gln Cys Thr Ser Asp Tyr Pro Glu His		
	530	535	540
	Val Cys Glu Val Leu Leu Thr Met Glu Arg Thr Glu Gly Ser Leu Glu		
25	545	550	555 560
	Asp Trp Asp Ile Ala Val Gln Lys Thr Glu Thr Arg Leu Ala Arg Val		
	565	570	575
	Asn Glu Gln Arg Met Lys Ala Ala Glu Lys Glu Ala Ala Leu Val Gln		
	580	585	590

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/32

Gln Glu Glu Glu Lys Ala Glu Gln Arg Lys Arg Ala Arg Ala Glu Lys
595 600 605

Lys Ala Leu Lys Lys Lys Lys Lys Ile Arg Gly Pro Glu Lys Arg Gly
610 615 620

5 Ala Asp Glu Asp Asp Glu Lys Glu Trp Gly Asp Asp Glu Glu Glu Gln
625 630 635 640

Pro Ser Lys Arg Arg Arg Val Glu Asn Ser Ile Pro Ala Ala Gly Glu
645 650 655

Thr Gln Asn Val Glu Val Ala Ala Gly Pro Ala Gly Lys Cys Ala Ala
10 660 665 670

Val Asp Val Glu Pro Pro Ser Lys Gln Lys Glu Lys Ala Ala Ser Leu
675 680 685

Lys Arg Asp Met Pro Lys Val Leu His Asp Ser Ser Lys Asp Ser Ile
690 695 700

15 Thr Val Phe Val Ser Asn Leu Pro Tyr Ser Met Gln Glu Pro Asp Thr
705 710 715 720

Lys Leu Arg Pro Leu Phe Glu Ala Cys Gly Glu Val Val Gln Ile Arg
725 730 735

Pro Ile Phe Ser Asn Arg Gly Asp Phe Arg Gly Tyr Cys Tyr Val Glu
20 740 745 750

Phe Lys Glu Glu Lys Ser Ala Leu Gln Ala Leu Glu Met Asp Arg Lys
755 760 765

Ser Val Glu Gly Arg Pro Met Phe Val Ser Pro Cys Val Asp Lys Ser
770 775 780

25 Lys Asn Pro Asp Phe Lys Val Phe Arg Tyr Ser Thr Ser Leu Glu Lys
785 790 795 800

His Lys Leu Phe Ile Ser Gly Leu Pro Phe Ser Cys Thr Lys Glu Glu
805 810 815

Leu Glu Glu Ile Cys Lys Ala His Gly Thr Val Lys Asp Leu Arg Leu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/32

820 825 830
 Val Thr Asn Arg Ala Gly Lys Pro Lys Gly Leu Ala Tyr Val Glu Tyr
 835 840 845
 Glu Asn Glu Ser Gln Ala Ser Gln Ala Val Met Lys Met Asp Gly Met
 5 850 855 860
 Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Lys Val Ala Ile Ser Asn Pro Pro Gln
 865 870 875 880
 Arg Lys Val Pro Glu Lys Pro Glu Thr Arg Lys Ala Pro Gly Gly Pro
 885 890 895
 10 Met Leu Leu Pro Gln Thr Tyr Gly Ala Arg Gly Lys Gly Arg Thr Gln
 900 905 910
 Leu Ser Leu Leu Pro Arg Ala Leu Gln Arg Pro Ser Ala Ala Ala Pro
 915 920 925
 Gln Ala Glu Asn Gly Pro Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala Pro Ala
 15 930 935 940
 Ala Thr Glu Ala Pro Lys Met Ser Asn Ala Asp Phe Ala Lys Leu Phe
 945 950 955 960
 Leu Arg Lys
 963

20

<210> 2

<211> 3798

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25

<400> 2

ccacgcgtcc g atg gcg act gcg gcc gaa acc tcg gct tca gaa ccc gag

50

Met Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ala Ser Glu Pro Glu

5

10

gct gag tcc aag gct ggg ccc aag gct gac gga gag gag gat gag gtt

98

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/32

	Ala	Glu	Ser	Lys	Ala	Gly	Pro	Lys	Ala	Asp	Gly	Glu	Glu	Asp	Glu	Val	
	15				20					25							
	aag	gcg	gct	agg	aca	agg	aga	aag	gtg	tta	tcg	cgg	gct	gtg	gcc	gct	146
	Lys	Ala	Ala	Arg	Thr	Arg	Arg	Lys	Val	Leu	Ser	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	
5	30				35				40				45				
	gcg	aca	tac	aag	acc	atg	ggg	cca	gcg	tgg	gat	cag	cag	gag	gaa	ggc	194
	Ala	Thr	Tyr	Lys	Thr	Met	Gly	Pro	Ala	Trp	Asp	Gln	Gln	Glu	Glu	Gly	
					50				55				60				
	gtg	agc	gag	agc	gat	ggg	gat	gag	tac	gcc	atg	gct	tcc	tcc	gcg	gag	242
10	Val	Ser	Glu	Ser	Asp	Gly	Asp	Glu	Tyr	Ala	Met	Ala	Ser	Ser	Ala	Glu	
					65				70				75				
	agc	tcc	ccc	ggg	gag	tac	gag	tgg	gaa	tat	gac	gaa	gag	gag	gag	aaa	290
	Ser	Ser	Pro	Gly	Glu	Tyr	Glu	Trp	Glu	Tyr	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	
					80				85				90				
15	aac	cag	ctg	gag	att	gag	aga	ctg	gag	gag	cag	ttg	tct	atc	aac	gtc	338
	Asn	Gln	Leu	Glu	Ile	Glu	Arg	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Ser	Ile	Asn	Val	
					95				100				105				
	tat	gac	tac	aac	tgc	cat	gtg	gac	ttg	atc	aga	ctg	ctc	agg	ctg	gaa	386
	Tyr	Asp	Tyr	Asn	Cys	His	Val	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Leu	Arg	Leu	Glu	
20	110				115				120				125				
	ggg	gag	ctt	acc	aag	gtg	agg	atg	gcc	cgc	cag	aag	atg	agt	gaa	atc	434
	Gly	Glu	Leu	Thr	Lys	Val	Arg	Met	Ala	Arg	Gln	Lys	Met	Ser	Glu	Ile	
					130				135				140				
	ttt	ccc	ttg	act	gaa	gag	ctc	tgg	ctg	gag	tgg	ctg	cat	gac	gag	atc	482
25	Phe	Pro	Leu	Thr	Glu	Glu	Leu	Trp	Leu	Glu	Trp	Leu	His	Asp	Glu	Ile	
					145				150				155				
	agc	atg	gcc	cag	gat	ggc	ctg	gac	aga	gag	cac	gtg	tat	gac	ctc	ttt	530
	Ser	Met	Ala	Gln	Asp	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	His	Val	Tyr	Asp	Leu	Phe	
					160				165				170				

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/32

	gag aaa gcc gtg aag gat tac att tgt cct aac att tgg cta gag tat	578
	Glu Lys Ala Val Lys Asp Tyr Ile Cys Pro Asn Ile Trp Leu Glu Tyr	
	175 180 185	
5	ggc cag tac tca gtt ggt ggg att ggt cag aaa ggt ggc ctt gag aaa	626
	Gly Gln Tyr Ser Val Gly Gly Ile Gly Gln Lys Gly Gly Leu Glu Lys	
	190 195 200 205	
	gtt cgc tcc gtg ttt gaa agg gct ctc tcg tct gtt ggt tta cat atg	674
	Val Arg Ser Val Phe Glu Arg Ala Leu Ser Ser Val Gly Leu His Met	
	210 215 220	
10	acc aaa gga ctc gcc ctc tgg gag gct tac cga gag ttt gaa agt gcg	722
	Thr Lys Gly Leu Ala Leu Trp Glu Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Ser Ala	
	225 230 235	
	att gtg gaa gct gct cgg ctt gag aaa gtc cac agt ctt ttc cgg cga	770
	Ile Val Glu Ala Ala Arg Leu Glu Lys Val His Ser Leu Phe Arg Arg	
15	240 245 250	
	cag ttg gcg atc cca ctc tat gat atg gag gcc aca ttt gca gag tat	818
	Gln Leu Ala Ile Pro Leu Tyr Asp Met Glu Ala Thr Phe Ala Glu Tyr	
	255 260 265	
	gaa gaa tgg tca gaa gac cca ata cca gag tca gta att cag aac tat	866
20	Glu Glu Trp Ser Glu Asp Pro Ile Pro Glu Ser Val Ile Gln Asn Tyr	
	270 275 280 285	
	aac aaa gca cta cag cag ctg gag aaa tat aaa ccc tat gaa gaa gca	914
	Asn Lys Ala Leu Gln Gln Leu Glu Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Glu Ala	
	290 295 300	
25	ctg ttg cag gca gag gca cca agg ctg gca gaa tat caa gca tat atc	962
	Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu Ala Glu Tyr Gln Ala Tyr Ile	
	305 310 315	
	gat ttt gag atg aaa att ggc gat cct gct cgc att cag ttg atc ttt	1010
	Asp Phe Glu Met Lys Ile Gly Asp Pro Ala Arg Ile Gln Leu Ile Phe	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/32

	320	325	330	
	gag cgc gcc ctg gtc gag aac tgc ctt gtc cca gac tta tgg atc cgt			1058
	Glu Arg Ala Leu Val Glu Asn Cys Leu Val Pro Asp Leu Trp Ile Arg			
	335	340	345	
5	tac agt cag tac cta gat cga caa ctg aaa gta aag gat ttg gtt tta			1106
	Tyr Ser Gln Tyr Leu Asp Arg Gln Leu Lys Val Lys Asp Leu Val Leu			
	350	355	360	365
	tct gta cat aac cgc gct att aga aac tgc ccc tgg aca gtt gcc tta			1154
	Ser Val His Asn Arg Ala Ile Arg Asn Cys Pro Trp Thr Val Ala Leu			
10	370	375	380	
	tgg agt cgg tac ctc ttg gcc atg gag aga cat gga gtt gat cat caa			1202
	Trp Ser Arg Tyr Leu Leu Ala Met Glu Arg His Gly Val Asp His Gln			
	385	390	395	
	gta att tct gta acc ttc gag aaa gct ttg aat gcc ggc ttc atc cag			1250
15	Val Ile Ser Val Thr Phe Glu Lys Ala Leu Asn Ala Gly Phe Ile Gln			
	400	405	410	
	gcc act gat tat gtg gag att tgg cag gca tac ctt gat tac ctg agg			1298
	Ala Thr Asp Tyr Val Glu Ile Trp Gln Ala Tyr Leu Asp Tyr Leu Arg			
	415	420	425	
20	aga agg gtt gat ttc aaa caa gac tcc agt aaa gag ctg gag gag ttg			1346
	Arg Arg Val Asp Phe Lys Gln Asp Ser Ser Lys Glu Leu Glu Glu Leu			
	430	435	440	445
	agg gcc gcc ttt act cgt gcc ttg gag tat ctg aag cag gag gtg gaa			1394
	Arg Ala Ala Phe Thr Arg Ala Leu Glu Tyr Leu Lys Gln Glu Val Glu			
25	450	455	460	
	gag cgt ttc aat gag agt ggt gat cca agc tgc gtg att atg cag aac			1442
	Glu Arg Phe Asn Glu Ser Gly Asp Pro Ser Cys Val Ile Met Gln Asn			
	465	470	475	
	tgg gct agg att gag gct cga ctg tgc aat aac atg cag aaa gct cgg			1490

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/32

	Trp	Ala	Arg	Ile	Glu	Ala	Arg	Leu	Cys	Asn	Asn	Met	Gln	Lys	Ala	Arg	
		480						485							490		
	gaa ctc tgg gat agc atc atg acc aga gga aat gcc aag tac gcc aac																1538
	Glu	Leu	Trp	Asp	Ser	Ile	Met	Thr	Arg	Gly	Asn	Ala	Lys	Tyr	Ala	Asn	
5		495						500							505		
	atg tgg cta gag tat tac aac ctg gaa aga gct cat ggt gac acc cag																1586
	Met	Trp	Leu	Glu	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Glu	Arg	Ala	His	Gly	Asp	Thr	Gln	
	510					515					520				525		
	cac tgc cgg aag gct ctg cac cgg gcc gtc cag tgc acc agt gac tac																1634
10	His	Cys	Arg	Lys	Ala	Leu	His	Arg	Ala	Val	Gln	Cys	Thr	Ser	Asp	Tyr	
					530					535					540		
	cca gag cac gtc tgc gaa gtg tta ctc acc atg gag agg aca gaa ggt																1682
	Pro	Glu	His	Val	Cys	Glu	Val	Leu	Leu	Thr	Met	Glu	Arg	Thr	Glu	Gly	
					545					550					555		
15	tct tta gaa gat tgg gat ata gct gtt cag aaa act gaa acc cga tta																1730
	Ser	Leu	Glu	Asp	Trp	Asp	Ile	Ala	Val	Gln	Lys	Thr	Glu	Thr	Arg	Leu	
					560					565					570		
	gct cgt gtc aat gag cag aga atg aag gct gca gag aag gaa gca gcc																1778
	Ala	Arg	Val	Asn	Glu	Gln	Arg	Met	Lys	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Ala	Ala	
20		575						580							585		
	ctt gtg cag caa gaa gaa gaa aag gct gaa caa cgg aaa aga gct cgg																1826
	Leu	Val	Gln	Gln	Glu	Glu	Glu	Lys	Ala	Glu	Gln	Arg	Lys	Arg	Ala	Arg	
	590					595					600				605		
	gct gag aag aaa gcg tta aaa aag aag aaa aag atc aga ggc cca gag																1874
25	Ala	Glu	Lys	Lys	Ala	Leu	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Ile	Arg	Gly	Pro	Glu
					610						615				620		
	aag cgc gga gca gat gag gac gat gag aaa gag tgg ggc gat gat gaa																1922
	Lys	Arg	Gly	Ala	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Lys	Glu	Trp	Gly	Asp	Asp	Glu	
					625						630				635		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/32

	gaa gag cag cct tcc aaa cgc aga agg gtc gag aac agc atc cct gca	1970
	Glu Glu Gln Pro Ser Lys Arg Arg Arg Val Glu Asn Ser Ile Pro Ala	
	640 645 650	
5	gct gga gaa aca caa aat gta gaa gta gca gca ggg ccc gct ggg aaa	2018
	Ala Gly Glu Thr Gln Asn Val Glu Val Ala Ala Gly Pro Ala Gly Lys	
	655 660 665	
	tgt gct gcc gta gat gtg gag ccc cct tcg aag cag aag gag aag gca	2066
	Cys Ala Ala Val Asp Val Glu Pro Pro Ser Lys Gln Lys Glu Lys Ala	
	670 675 680 685	
10	gcc tcc ctg aag agg gac atg ccc aag gtg ctg cac gac agc agc aag	2114
	Ala Ser Leu Lys Arg Asp Met Pro Lys Val Leu His Asp Ser Ser Lys	
	690 695 700	
	gac agc atc acc gtc ttt gtc agc aac ctg ccc tac agc atg cag gag	2162
	Asp Ser Ile Thr Val Phe Val Ser Asn Leu Pro Tyr Ser Met Gln Glu	
15	705 710 715	
	ccg gac acg aag ctc agg cca ctc ttc gag gcc tgt ggg gag gtg gtc	2210
	Pro Asp Thr Lys Leu Arg Pro Leu Phe Glu Ala Cys Gly Glu Val Val	
	720 725 730	
	cag atc cga ccc atc ttc agc aac cgt ggg gat ttc cga ggt tac tgc	2258
20	Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Gly Asp Phe Arg Gly Tyr Cys	
	735 740 745	
	tac gtg gag ttt aaa gaa gag aaa tca gcc ctt cag gca ctg gag atg	2306
	Tyr Val Glu Phe Lys Glu Glu Lys Ser Ala Leu Gln Ala Leu Glu Met	
	750 755 760 765	
25	gac cgg aaa agt gta gaa ggg agg cca atg ttt gtt tcc ccc tgt gtg	2354
	Asp Arg Lys Ser Val Glu Gly Arg Pro Met Phe Val Ser Pro Cys Val	
	770 775 780	
	gat aag agc aaa aac ccc gat ttt aag gtg ttc agg tac agc act tcc	2402
	Asp Lys Ser Lys Asn Pro Asp Phe Lys Val Phe Arg Tyr Ser Thr Ser	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/32

	785	790	795	
	cta gag aaa cac aag ctg ttc atc tca ggc ctg cct ttc tcc tgt act			2450
	Leu Glu Lys His Lys Leu Phe Ile Ser Gly Leu Pro Phe Ser Cys Thr			
	800	805	810	
5	aaa gag gaa cta gaa gaa atc tgt aag gct cat ggc acc gtg aag gac			2498
	Lys Glu Glu Leu Glu Glu Ile Cys Lys Ala His Gly Thr Val Lys Asp			
	815	820	825	
	ctc agg ctg gtc acc aac cgg gct ggc aaa cca aag ggc ctg gcc tac			2546
	Leu Arg Leu Val Thr Asn Arg Ala Gly Lys Pro Lys Gly Leu Ala Tyr			
10	830	835	840	845
	gtg gag tat gaa aat gaa tcc cag gcg tcg cag gct gtg atg aag atg			2594
	Val Glu Tyr Glu Asn Glu Ser Gln Ala Ser Gln Ala Val Met Lys Met			
	850	855	860	
	gac ggc atg act atc aaa gag aac atc atc aaa gtg gca atc agc aac			2642
15	Asp Gly Met Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Lys Val Ala Ile Ser Asn			
	865	870	875	
	cct cct cag agg aaa gtt cca gag aag cca gag acc agg aag gca cca			2690
	Pro Pro Gln Arg Lys Val Pro Glu Lys Pro Glu Thr Arg Lys Ala Pro			
	880	885	890	
20	ggt ggc ccc atg ctt ttg ccg cag aca tac gga gcg agg ggg aag gga			2738
	Gly Gly Pro Met Leu Leu Pro Gln Thr Tyr Gly Ala Arg Gly Lys Gly			
	895	900	905	
	agg acg cag ctg tct cta ctg cct cgt gcc ctg cag cgc cca agt gct			2786
	Arg Thr Gln Leu Ser Leu Leu Pro Arg Ala Leu Gln Arg Pro Ser Ala			
25	910	915	920	925
	gca gct cct cag gct gag aac ggc cct gcc gcg gct cct gca gtt gcc			2834
	Ala Ala Pro Gln Ala Glu Asn Gly Pro Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala			
	930	935	940	
	gcc cca gca gcc acc gag gca ccc aag atg tcc aat gcc gat ttt gcc			2882

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12/32

Ala Pro Ala Ala Thr Glu Ala Pro Lys Met Ser Asn Ala Asp Phe Ala

945

950

955

aag ctg ttt ctg aga aag tgaacgggac gctgggagac aggaaatgcc 2930

Lys Leu Phe Leu Arg Lys

5

960

ttacttcact ctggcccggc ggacctccca ccaccagca gtgcactggg gatggacagg 2990

cctgggtgtgc tgcgtgctcg caaccacaga tggtcctcg gctttagaca gaaaggggaa 3050

ggggttctaa gtcaagagcc tttcagtgt cctcatatt gagggcagtg gcagaaaagt 3110

gaccactctg caggctgggc ccaggatgtg gtgtcctgag atagttttgt atcttaaaga 3170

10

ctgaggcaca gaagcgaaac gagaacacac tgtttttgag acacagttgt ccaaattgtt 3230

ctggccagct cgggcccctt ttgtatgac acttctcttc caccctgcac agcacatgtg 3290

cccgtcattc ttttaatttt aaaagatgaa atggcagatg ctagtaattc acagaatggc 3350

ctcttggtgg ggtgggtctg aggggaagtca gctataaaac atttgctgga gttttgttca 3410

atggggctgt gcatttttat attatgtgtt tgtaaattgac atgtcagccc ttgtttcatg 3470

15

tttcctaaaa gcagaatatt tgcaacattt gttttgtata ggaattattt gtgccacctg 3530

ctgtggactg ttttctttgc ctagtacta gtgacctgtg ttgtctaaac atgagtttca 3590

gccctttggt tttgtttaat accatgtcaa atgcaaactt caattctccc catttagctt 3650

tattaaactg acgttctctt caaaacttct tgctgaatgg tactcagatg tgcattcaca 3710

tacagatgtg ttttgaagtg ggtgtacctt gctttaccta atagatgtgt aaatagaact 3770

20

tttghtaagtc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3798

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu

5

10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13/32

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 4

Leu Phe Glu Lys Ala Val Lys Asp Tyr Ile

5

10

<210> 5

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Tyr Asn Lys Ala Leu Gln Gln Leu

15

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Tyr Ile Asp Phe Glu Met Lys Ile

5

25 <210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14/32

Asp Tyr Val Glu Ile Trp Gln Ala Tyr Leu

5

10

<210> 8

5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Tyr Leu Arg Arg Arg Val Asp Phe

10

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Phe Thr Arg Ala Leu Glu Tyr Leu

5

20

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

25

Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Ile

5

<210> 11

<211> 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15/32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ile Phe Pro Leu Thr Glu Glu Leu Trp Leu

5

5

10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Tyr Ile Cys Pro Asn Ile Trp Leu

5

15

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

20

Glu Tyr Gly Gln Tyr Ser Val Gly Gly Ile

5

10

<210> 14

<211> 9

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Ser Ala Ile

5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16/32

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 15

Leu Phe Arg Arg Gln Leu Ala Ile Pro Leu

5

10

10 <210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

15 Glu Tyr Glu Glu Trp Ser Glu Asp Pro Ile

5

10

<210> 17

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Glu Ala Leu

5

25

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/32

<400> 18

Arg Tyr Ser Gln Tyr Leu Asp Arg Gln Leu

5

10

5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

10

Thr Phe Glu Lys Ala Leu Asn Ala Gly Phe

5

10

<210> 20

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Phe Lys Gln Asp Ser Ser Lys Glu Leu

5

10

20

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 21

Asp Tyr Pro Glu His Val Cys Glu Val Leu

5

10

<210> 22

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18/32

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

5 Asp Phe Arg Gly Tyr Cys Tyr Val Glu Phe

5

10

<210> 23

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Phe Lys Glu Glu Lys Ser Ala Leu

5

15

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 24

Pro Phe Ser Cys Thr Lys Glu Glu Leu

5

<210> 25

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Trp Leu His Asp Glu Ile Ser Met Ala

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19/32

5

<210> 26

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Leu Phe Arg Arg Gln Leu Ala Ile

5

10

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 27

Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu

5

<210> 28

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Leu Ala Glu Tyr Gln Ala Tyr Ile

25

5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

20/32

<213> Homo sapiens

<400> 29

Leu Leu Ala Met Glu Arg His Gly Val

5

5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 30

Asn Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val

5

<210> 31

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Lys Met Ser Glu Ile Phe Pro Leu Thr

20

5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<400> 32

Trp Leu Glu Tyr Gly Gln Tyr Ser Val

5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

21/32

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 33

Ser Val Phe Glu Arg Ala Leu Ser Ser Val

5

10

<210> 34

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ala Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu

15

5

10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 35

Lys Ile Gly Asp Pro Ala Arg Ile Gln Leu

5

10

25 <210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

THIS PAGE BLANK (USPTO)

22/32

Ile Gln Leu Ile Phe Glu Arg Ala Leu Val

5

10

<210> 37

5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Leu Ile Phe Glu Arg Ala Leu Val

10

5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 38

Asp Leu Trp Ile Arg Tyr Ser Gln Tyr Leu

5

10

<210> 39

<211> 9

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Leu Trp Ser Arg Tyr Leu Leu Ala

5

25

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

THIS PAGE BLANK (USPTO)

23/32

<400> 40

Ala Leu Trp Ser Arg Tyr Leu Leu Ala Met

5

10

5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

10

Tyr Leu Leu Ala Met Glu Arg His Gly Val

5

10

<210> 42

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ala Leu Asn Ala Gly Phe Ile Gln Ala Thr

5

10

20

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 43

Tyr Leu Asp Tyr Leu Arg Arg Arg Val

5

<210> 44

THIS PAGE BLANK (USPTO)

24/32

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

5 Ile Met Thr Arg Gly Asn Ala Lys Tyr Ala

5

10

<210> 45

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Asn Met Trp Leu Glu Tyr Tyr Asn Leu

5

15

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 46

Val Leu His Asp Ser Ser Lys Asp Ser Ile

5

10

<210> 47

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ser Ile Thr Val Phe Val Ser Asn Leu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25/32

5

<210> 48

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Met Gln Glu Pro Asp Thr Lys Leu

5

10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 49

Lys Ser Val Glu Gly Arg Pro Met Phe Val

5

10

<210> 50

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Lys Val Phe Arg Tyr Ser Thr Ser Leu

25

5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26/32

<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Leu Leu Pro Gln Thr Tyr Gly Ala

5

5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 52

Lys Met Ser Asn Ala Asp Phe Ala Lys Leu

5

10

<210> 53

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

20

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

25

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 53

Val Xaa Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Xaa

5

10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

27/32

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

10 <221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 54

Leu Xaa Glu Lys Ala Val Lys Asp Tyr Xaa

15 5 10

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

25 <220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 55

THIS PAGE BLANK (USPTO)

28/32

Asn Xaa Asn Lys Ala Leu Gln Gln Xaa

5

<210> 56

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

10 <222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

15 <223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 56

Ala Xaa Ile Asp Phe Glu Met Lys Xaa

5

20 <210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

25 <221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

29/32

<222> 10

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 57

Asp Xaa Val Glu Ile Trp Gln Ala Tyr Xaa

5

5

10

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

15

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 58

20

Asp Xaa Leu Arg Arg Arg Val Asp Xaa

5

<210> 59

<211> 9

25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30/32

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

5 <223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 59

Ala Xaa Thr Arg Ala Leu Glu Tyr Xaa

5

10 <210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

<220>

<221> VARIANT

20 <222> 9

<223> Xaa is Val or Leu.

<400> 60

Trp Xaa His Asp Glu Ile Ser Met Xaa

5

25

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

31/32

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

5 <220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Val or Leu.

<400> 61

10 Ser Xaa Phe Arg Arg Gln Leu Ala Xaa

5

<210> 62

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

20 <223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Val or Leu.

25 <400> 62

Leu Xaa Gln Ala Glu Ala Pro Arg Xaa

5

<210> 63

THIS PAGE BLANK (USPTO)

32/32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

<220>

<221> VARIANT

10 <222> 9

<223> Xaa is Val or Leu.

<400> 63

Arg Xaa Ala Glu Tyr Gln Ala Tyr Xaa

5

15

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20 <220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

<220>

25 <221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Val or Leu.

<400> 64

Leu Xaa Ala Met Glu Arg His Gly Xaa

30

5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N5/10, C12P21/02, C07K14/47, C07K16/30,
A61K31/70, A61K48/00, A61K38/17, A61K39/00, A61K 35/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq MEDLINE (STN) REGISTRY (STN) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shigeki Shichijo et al. "A Gene Encoding Antigenic Peptides of Human Squamous Cell Carcinoma Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes" J. Exp. Med (2 February, 1998), Vol. 187, No. 3, Pages 277-288	1-31
A	Rumi Gohara "Histocompatibility Leukocyte Antigen-A2402-restricted Cytotoxic T Lymphocytes Recognizing Adenocarcinoma in Tumor-infiltrating Lymphocytes of Patients with Coiono Cancer" Jpn. J. Cancer Res (February, 1997), Vol. 88, No. 2, Pages 198-204	1-31
A	Takahiro Nagase "Prediction of tha Coding sequences of Unidentified Human Genes. IV. Tha Coding of 40 New Genes (KIAA0121-KIAA0160) Deduced by Analysis of cDAN Clones from Human Cell Line KG-1" J. Clin. Invest. (August, 1995), Vol. 2, No.4, Pages 167-174	1-31
A	P. Yotnda "Cytotoxic T cell Respone against the Chimeric ETV6-AML1 Protein in Childhood Acute Lymphblastic Leukemia" J. Clim. Invest. (July, 1998), Vol. 102, No. 2, Pages 455-462	1-31



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*

Special categories of cited documents:

"A"

document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"

earlier document but published on or after the international filing date

"L"

document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O"

document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"

document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 November, 1999 (15.11.99)

Date of mailing of the international search report

24 November, 1999 (24.11.99)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04622

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takenori Takahashi "Recognition of gp43 Tumor-Associated Antigen Peptide by both HLA-A2 Restricted CTL Lines and Antibodies from Melanoma Patients" Cellular Immunology (15 June, 1997), Vol. 178, No. 2, Pages 162-171	1-31

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C12N 5/10, C12P 21/02, C07K 14/47, C07K16/30, A61K 31/70, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/00, A61K 35/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq MEDLINE (STN) REGISTRY (STN) Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Shigeki Shichijo et al. "A Gene Encoding Antigenic Peptides of Human Squamous Cell Carcinoma Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes" J. Exp. Med (February 2, 1998) Vol. 187. No. 3 P. 277-288	1-31
A	Rumi Gohara "Histocompatibility Leukocyte Antigen-A2402-restricted Cytotoxic T Lymphocytes Recognizing Adenocarcinoma in Tumor-infiltrating Lymphocytes of Patients with Coion Cancer" Jpn. J. Cancer Res (February, 1997) Vol. 88 No. 2 P. 198-204	1-31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 11. 99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Takahiro Nagase "Prediction of the Coding sequences of Unidentified Human Genes. IV. The Coding of 40 New Genes (KIAA0121-KIAA0160) Deduced by Analysis of cDNA Clones from Human Cell Line KG-1" J. Clin. Invest. (August 1995) Vol. 2 No. 4 P. 167-174	1-31
A	P. Yotnda "Cytotoxic T cell Response against the Chimeric ETV6-AML1 Protein in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia" J. Clin. Invest. (July 1998) Vol. 102 No. 2 P. 455-462	1-31
A	Takenori Takahashi "Recognition of gp43 Tumor-Associated Antigen Peptide by both HLA-A2 Restricted CTL Lines and Antibodies from Melanoma Patients" Cellular Immunology (June 15, 1997) Vol. 178 No. 2 P. 162-171	1-31